

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Pós-graduação em Patologia

**PERFIL DA RESPOSTA IMUNE LOCAL EM
PACIENTES COM LESÃO INTRAEPITELIAL
CERVICAL DE BAIXO GRAU, ALTO GRAU E
NEOPLASIA INVASIVA**

Bethânça Crema Peghini

Uberaba, MG, 2009

Bethânea Crema Peghini

**PERFIL DA RESPOSTA IMUNE LOCAL EM
PACIENTES COM LESÃO INTRAEPITELIAL
CERVICAL DE BAIXO GRAU, ALTO GRAU E
NEOPLASIA INVASIVA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração Patologia Geral, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor.

Prof^a. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Antoniazi Michelin.

Co-Orientador: Prof. Dr. Eddie
Fernando Cândido Murta.

Abril, 2009

Catálogo na fonte: Biblioteca da UFTM

P423p

Peghini, Bethânea Crema

Perfil da resposta imune local de pacientes com lesão intraepitelial cervical de baixo grau, alto grau e neoplasia invasiva / Bethânea Crema Peghini - 2009.

121 f.: tab.; graf.; fig.;

Tese (Doutorado em Patologia Geral) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2009.

Orientador: Profª. Drª. Márcia Antoniazi Michelin.

Co-orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta.

1. Neoplasias do Colo Uterino. 2. Citocinas. 3. Resposta Imune. I. Título. II. Michelin. III. Murta.

CDU 618.146-006

 Dedicatória

Ao meu marido J. Faria A. Júnior, por ser ele tudo o que sempre desejei, pela paciência, compreensão, dedicação a mim e pela satisfação com minhas conquistas mais do que com as próprias. Você torna meus caminhos mais suaves. Amo você.

Aos meus pais: Jesus Otávio e Maria Aparecida & aos meus pais adotivos: José Faria e Fernanda Rocha pelas ajudas diárias, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas, saibam que vocês contribuíram muito com esta conquista.

Às minhas irmãs e cunhados: Ana Karolina & Bruno; Andréa & Maurício pelas palavras de carinho, constantes ajudas e incentivo, em todos os momentos, vocês tornam nossas famílias mais felizes.

Aos meus lindos e queridos afilhados: Léo, Sofia e Mateus, vocês são anjos que enchem nossos corações de alegrias.

À minha cunhada Alessandra e seu esposo Hemerson, pelo apoio e estímulo sempre.

Ao meu querido Tio Eurípides Peghini, por ter me dado condições de tornar realidade minha caminhada de sonhos e esperanças. Você permitiu que eu plantasse e adubasse os meus sonhos, os meus ideais, e agora, graças a sua boa vontade aliada à suas ações, estou podendo colher ótimos frutos, porque de ações boas só se pode colher excelentes resultados.

Agradecimentos

Agradeço a Deus e aos amigos espirituais, por permitir e dar-me condições, que mais um sonho, e mais uma etapa fosse alcançada.

À prof^a. Dr^a. Márcia Antoniazi Michelin, pela oportunidade de fazer o doutorado, pelo convívio pessoal e profissional, foram três anos de novas descobertas e aprendizado constante. Terei sempre boas lembranças desse período.

Ao prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta, pela oportunidade de fazer parte dos grupos de pesquisas do Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON), pela inestimável contribuição ao meu aprendizado.

À prof^a. Dr^a. Ana Cristina Macedo Barcelos pela dedicação e boa vontade nas coletas das amostras, pelos ensinamentos, e além de tudo pela amizade.

À prof^a. Edna Valim pelos ensinamentos, por ajudar-me a superar algumas das minhas limitações profissionais e pessoais. Muitas vezes você me mostrou que sou capaz.

A todos os professores do curso de Pós-graduação em Patologia, pela contribuição ao ensino.

Aos amigos da disciplina de Imunologia: Fabiano e Maria Lúcia pela amizade, e ajuda em todos os momentos que precisei.

Ao prof. Cláudio Simon pelos conselhos, dicas e ensinamentos, todos com certeza fazem a diferença.

Ao nosso reitor, prof. Dr. Virmondes e sua esposa prof^a. Dr^a. Denise Bertolluci, pela confiança, carinho e respeito, pelos quais sempre me trataram durante a permanência no laboratório de Imunologia.

Aos amigos do laboratório de Imunologia: Karine Resende, Cristina Widde, César, Betânia Ribeiro, Carlos, Lílian, Juliana, Marcos, Mônica, Lúcio, Cláudia Bibiano, em especial à minha amiga Ana Cristina Lopes Tosta, muito obrigada pela amizade, carinho e auxílio de todos vocês.

Agradeço às minhas amigas e companheiras do IPON: Fernanda Alves Machado, Jéssica Liver, Cláudia Rodrigues Mendonça, Bruna França Matias e Talita Leonel, pela amizade, auxílio, respeito, confiança, vocês são muito melhores do que imaginam ser.

Aos amigos do IPON: Nelson Ranieri, George, Douglas e Mauro, pelo respeito e amizade, em especial ao querido Celso Tadeu, que não mediu esforços para contribuir com o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do laboratório de ginecologia e obstetícia: Heloisa, Zelma, Nilva, Doris, Dr^a. Vera, agradeço pela amizade conquistada por cada uma de vocês e pelo auxílio nunca negado. Vocês são pessoas que fazem a diferença.

Aos amigos Kátia e Divo, pelo incentivo nas horas mais difíceis. Obrigada Tia Kátia pelas palavras de conforto e ânimo.

Às pacientes por aceitarem contribuir com o progresso da ciência.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), onde foi realizado este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

DURANTE ESTE TRABALHO...

As dificuldades não foram poucas...

Os desafios foram muitos...

Os obstáculos, muitas vezes, pareciam intransponíveis.

Muitas vezes nos sentimos só, e, assim, o estivemos...

O desânimo quis contagiar, porém, a garra e a tenacidade foram mais fortes, sobrepondo esse sentimento, fazendo-nos seguir a caminhada, apesar da sinuosidade do caminho. Agora, ao olharmos para trás, a sensação do dever cumprido se faz presente e podemos constatar que as noites de sono perdidos, o cansaço da digitação, os longos tempos de leituras realizadas, a ansiedade em querer fazer o melhor e a angústia de muitas vezes não o conseguir; não foram em vão.

Aqui estamos, como sobreviventes de uma longa batalha, porém, muito mais fortes e hábeis, com coragem suficiente para mudar a nossa postura, apesar de todos os percalços...

Como dizia *Antoine Saint Exupéry* em sua obra prima “*O Pequeno Príncipe*”:

***“Foi o tempo que perdeste com a tua rosa,
que fez a tua rosa tão importante.”***

Sumário

1. Introdução.....	01
1.1 - Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) & Neoplasia Cervical Invasiva..	04
1.2 - Citocinas & Perfil de Resposta Imune.....	07
1.3 - Perfil de Resposta Imune nas Lesões Cervicais.....	13
2. Objetivos.....	23
2.1 – Objetivos Gerais.....	23
2.2 – Objetivos Específicos.....	23
3. Pacientes & Métodos.....	25
3.1 – Casuística.....	25
3.2 – Métodos Clínicos.....	26
3.3 – Coleta do Material.....	26
3.4 – Extração do RNA.....	26
3.5 – Obtenção do RNA.....	27
3.6 - Transcrição Reversa de RNA para cDNA.....	27
3.7 - Protocolo da RT-PCR para as Citocinas.....	29
3.8 - Ciclos de Amplificação das RT-PCRs para Citocinas.....	31
3.9 - Detecção dos Produtos Amplificados.....	31
4. Análise Estatística.....	32

5. Resultados.....	33
5.1 – Amostras Coletadas.....	33
5.2 – Citocinas Avaliadas.....	37
5.2.1 – Citocinas expressas pelo Grupo Controle.....	37
5.2.2 – Citocinas expressas pelo Grupo de Pacientes com Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL).....	39
5.2.3 – Citocinas expressas pelo Grupo de Pacientes com Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL).....	41
5.2.4 – Citocinas expressas pelo Grupo de Pacientes com Lesões Invasivas.....	42
5.2.5 - Citocinas expressas pelas Pacientes LSIL / HSIL / Invasivos comparada com as Citocinas expressas pelas Pacientes do grupo Controle.....	44
5.3 - Perfil da Resposta Imune.....	48
5.3.1 – Perfil da Resposta Imune Local das pacientes do Grupo Controle.....	48
5.3.2- Perfil da Resposta Imune das Pacientes que apresentaram Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LISL).....	50
5.3.3 - Perfil da Resposta Imune das Pacientes que apresentaram Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL).....	51
5.3.4 - Perfil da Resposta Imune das Pacientes que apresentaram Lesões Invasivas.....	53
5.3.5 – Comparação entre o Perfil da Resposta Imune Local das pacientes dos grupos LSIL, HSIL e Lesões Invasivas em relação às do grupo Controle.....	55
6 – Discussão.....	60
7 – Resumo dos Resultados.....	76
8 – Conclusões.....	77

9 – Referências Bibliográficas.....	78
10 – Resumo.....	93
11 - Abstract.....	95
12 – Anexos.....	97

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Distribuição das pacientes com lesão e o grupo controle atendidas na Ginecologia do Ambulatório Maria da Glória – UFTM.
- Tabela 2.** Distribuição das amostras coletadas em três diferentes grupos de lesões cervicais.
- Tabela 3.** Distribuição da faixa etária das pacientes do grupo controle atendidas no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia Maria da Glória - UFTM.
- Tabela 4.** Distribuição da Faixa etária das pacientes com lesão intraepitelial cervical atendidas no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia Maria da Glória – UFTM.
- Tabela 5.** Distribuição da frequência da faixa etária no grupos das pacientes com LSIL.
- Tabela 6.** Distribuição da frequência da faixa etária no grupos das pacientes com HSIL.
- Tabela 7.** Distribuição da frequência da faixa etária no grupos das pacientes lesão invasiva.
- Tabela 8.** Citocinas positivas no Grupo Controle.
- Tabela 9.** Citocinas Expressas pelas pacientes do Grupo LSIL.
- Tabela 10.** Citocinas Expressas pelas pacientes do Grupo HSIL.
- Tabela 11.** Citocinas Expressas pelas pacientes do Grupo Invasivo.
- Tabela 12.** Número, porcentagem e significância das amostras LSIL/HSIL/Invasivos e amostras controles positivas para as citocinas estudadas e β -actina.

- Tabela 13.** Positividade das citocinas e Perfil da Resposta nas amostras controles.
- Tabela 14.** Positividade das Citocinas e Perfil da Resposta Imune nas pacientes do grupo LSIL.
- Tabela 15.** Positividade das Citocinas e Perfil da Resposta Imune nas pacientes do grupo HSIL.
- Tabela 16.** Positividade das Citocinas e Perfil da Resposta Imune nas pacientes do grupo com Lesões Invasivas.
- Tabela 17.** Perfil de Respostas Imune Local das Pacientes LSIL/HSIL/Invasivos em relação às pacientes Controles.
- Tabela 18.** Comparação da expressão das citocinas das pacientes controles e aquelas com lesão caracterizadas no perfil de resposta imune do tipo Th1.
- Tabela 19.** Comparação da expressão das citocinas das pacientes controles e aquelas com lesão caracterizadas no perfil de resposta imune do tipo Th2.
- Tabela 20.** Comparação da expressão das citocinas das pacientes controles e aquelas com lesão caracterizadas no perfil de resposta imune do tipo Treg.
- Tabela 21.** Comparação da expressão das citocinas das pacientes controles e aquelas com lesão caracterizadas no perfil de resposta imune do tipo indeterminado.

Lista de Gráficos

- Gráfico 1.** Citocinas positivas nas amostras controles.
- Gráfico 2.** Distribuição da positividade das citocinas avaliadas no estudo em relação ao grupo de pacientes com LSIL.
- Gráfico 3.** Positividade e porcentagem das citocinas em relação às amostras HSIL.
- Gráfico 4.** Positividade e porcentagem das citocinas nas amostras com Lesões Invasivas.
- Gráfico 5.** Distribuição da positividade das citocinas avaliadas no estudo em relação ao grupo de pacientes com LSIL/HSIL/Invasivos.
- Gráfico 6.** Distribuição da positividade das citocinas avaliadas no estudo em relação ao grupo controle.
- Gráfico 7.** Tendência Linear da expressão da porcentagem das citocinas estudadas nos diferentes graus de lesão: LSIL, HSIL, Invasivo e no grupo Controle.
- Gráfico 8.** Perfil da Resposta Imune no Grupo Controle.
- Gráfico 9.** Perfil da Resposta Imune no grupo das pacientes LSIL.
- Gráfico 10.** Perfil da Resposta Imune dentre as amostras HSIL.
- Gráfico 11.** Perfil da Resposta Imune nas amostras com carcinoma invasivo.
- Gráfico 12.** Caracterização do Perfil da Resposta Imune das Amostras LSIL/HSIL/Invasivos.

Gráfico 13.

Tendência linear do Perfil da Resposta Imune nos diferentes graus de lesão: LSIL, HISL, Invasivos e no grupo Controle.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

- AGUS: Células glandulares atípicas de significado indeterminado
- ASC: Células escamosas atípicas
- ASC-H: Células escamosas atípicas de significado indeterminado não se podendo excluir
- ASCUS: Células escamosas atípicas de significado indeterminado
- ASC-US: Células escamosas atípicas de significado indeterminado
- CD: Cluster Differentiation
- CD25: Cluster of differentiation 25
- CD4: Cluster of differentiation 4
- CDK: Ciclina Dependente de Kinase
- cDNA: Ácido desoxiribonucléico complementar
- cm: Centímetro
- CTL: Linfócito T Citotóxico
- CTLA-4: Cytotoxic T lymphocyte antigen-4
- CTLA-4: Gene que codifica a proteína CTLA-4
- DEPC: Dietilpirocarbonato
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- dNTP: desoxinucleotídeo trifosfatado
- EDTA: ácido etileno diamino tetracético
- *et al*: e colaboradores
- FOXP3: Forkhead Transcription Factor
- g: Grama (s)
- HCV: vírus da hepatite C

- HE: Hospital Escola
- HPV: Papiloma Vírus Humano
- HSIL: Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
- IFN: interferon
- IgA: Imunoglobulina A
- IgG: Imunoglobulina G
- IL: Interleucina
- μL : microlitro (s)
- IL: Interleucina
- IL-2: Interleucina-2
- IL-4: Interleucina-4
- IL-10: Interleucina-10
- IL-12: Interleucina-12
- INCA: Instituto Nacional de Câncer
- IFN- γ : Interferon-gama
- IPON: Instituto de Pesquisa em Oncologia
- Kb: Kilobases
- KCl: cloreto de potássio
- Kg: Kilograma
- LSIL: Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
- M = Molar
- mg: micrograma (s)
- MgCl: Cloreto de Magnésio
- MHC: Major histocompatibility complex
- mL = Mililitro (s)

- mM: milimolar
- mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro
- NaCl: cloreto de sódio
- NaOH: hidróxido de sódio
- ng: nanograma
- NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical
- NIC I: Neoplasia intraepitelial cervical grau I
- NIC II: Neoplasia intraepitelial cervical grau II
- NIC III: Neoplasia intra-epitelial cervical grau III
- NK: Células natural killer
- Nm: nanômetros
- °C: Grau Celsius
- PAMAP: Padrões Moleculares Associados à Patógenos
- Pb: pares de bases
- PCR: Polymerase Chain Reaction
- pH: potencial de hidrogeniônico
- pmol: picomol
- RNA: Ácido ribonucléico
- Rpm: Rotações por minuto
- SIL: Lesão intra-epitelial escamosa
- TBE: Solução de Tris, EDTA e Ácido bórico.
- TCR: Receptor de Células T
- TE-Low: Solução de Tris, EDTA.
- TGF- β : Fator de Crescimento Transformador- β

- Th1: linfócitos T auxiliares tipo 1
- Th2: linfócitos T auxiliares tipo 2
- TNF- α : Fator de Necrose Tumoral - alfa
- Treg: Células T regulatórias
- Tris: hidroximetil amino metano
- U: unidade universal
- UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro
- μL : Microlitro
- α : Alfa
- β : beta
- γ : Gama
- % = Porcento
- ηg = Nanograma

1- Introdução

1 Apesar de existirem estratégias eficazes para a prevenção do câncer de colo do
2 útero, esta doença continua sendo um grave problema de saúde em todo o mundo. Com
3 valores aproximados de 500 mil casos novos por ano em todo o mundo e 230 mil óbitos, o
4 câncer cervical é o segundo mais comum entre as mulheres só perdendo, portanto, para o
5 câncer de mama que ocupa a primeira posição com 39.530 mil novos casos/ano (INCA,
6 2009).

7 Para o ano de 2008 a estimativa do número de novos casos de câncer do colo do
8 útero para o Brasil foi de 18.680, com risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres.
9 O câncer do colo do útero é o mais incidente na região Norte (22/100.000). Nas regiões Sul
10 (24/100.000), Centro-Oeste (19/100.000) e Nordeste (18/100.000) ocupam a segunda
11 posição e, no Sudeste (18/100.000) a quarta posição, com estimativa de 9.840 mil novos
12 casos para o ano de 2008, isso é, quando não considerado os tumores de pele não
13 melanoma (INCA, 2009).

14 Em Minas gerais, a taxa estimada para o câncer cervical, para o ano de 2008, foi de
15 13,48 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2009). No entanto, esses números
16 poderiam ser menores, visto que o câncer de colo uterino é uma doença que pode ser
17 evitada através da detecção e tratamento das lesões pré-neoplásicas.

18 A etiologia da neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e do câncer de colo uterino
19 ainda não está totalmente esclarecida, porém desde a década de sessenta, tem se
20 relacionado esta neoplasia com agentes infecciosos de transmissão sexual (BAUER *et al*,
21 1991; MUNZÕ *et al*, 1994). Inicialmente, acreditava-se que o agente etiológico mais

1 provável desta associação fosse o *Herpesvirus* tipo 2 (BOSCH *et al*, 1992; MUNÕZ *et al*,
2 1993) e até já aventou a possibilidade de que a *Clamidia tracomatis* pudesse predispor ao
3 câncer de colo uterino. Entretanto, nas últimas décadas, surgiram evidências
4 epidemiológicas e laboratoriais de que o *Papilomavírus humano* (HPV) seja o principal
5 envolvido na gênese do câncer cervical e da NIC (KOBAYASHI *et al*, 2000).

6 A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é considerada comum nas mulheres,
7 e portanto, o fator de risco mais importante na etiopatogênese do câncer cervical e de suas
8 lesões precursoras, as Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NICs). O carcinoma cervical
9 está caracterizado por uma fase pré-maligna bem definida, em que o diagnóstico pode ser
10 através dos exames citológico, colposcópico ou histopatológico do material cervical
11 (INCA, 2009). As modificações epiteliais cervicais nas NICs, representam um espectro de
12 anormalidades histológicas, variando de NIC I a III (carcinoma *in situ*), carcinoma
13 escamoso, adenocarcinoma *in situ* e adenocarcinoma (SELLORS &
14 SANKARANARAYANAN, 2004).

15 Avanços na virologia tumoral têm mostrado que infecção genital por certos tipos de
16 HPV tem papel relevante no desenvolvimento do câncer cervical. Entretanto, a infecção
17 por HPV não é o suficiente para produzir transformação neoplásica, e cofatores são
18 requeridos para a expressão total da oncogenicidade. Vários fatores de risco têm sido
19 associados com a presença do HPV (PEREYRA, GUERRA & VILLA, 2004). O maior
20 deles é a presença de doença intraepitelial e invasiva, desde que a taxa de detecção de
21 DNA-HPV se aproxima de 100% nessas lesões. Contudo, a prevalência das infecções por
22 HPV, na população geral, é muito menor e determinada por vários fatores. Alguns fatores
23 aumentam o risco de infecção por HPV, para neoplasia associada ao HPV ou, ainda, para
24 ambos. Os fatores de risco mais importantes são idade, imunossupressão, comportamento

1 sexual, contraceptivos orais e hormônios, gravidez, tabagismo e nutrição (BOSCH *et al.*
2 1997).

3 Diversas pesquisas sustentam a existência de uma associação entre a oncogênese e
4 a evolução neoplásica relacionada ao papilomavírus humano e ao sistema imunológico.
5 Porém, ainda não se sabe ao certo como e quais, os mecanismos precisos que
6 desencadeiam uma resposta imune eficiente contra as lesões relacionadas ao HPV. Tais
7 mecanismos podem se relacionar à ativação do sistema imunológico e/ou à composição
8 genética do indivíduo (PINTO, TÚLIO & CRUZ, 2002).

9 Inúmeras evidências sugerem e/ou demonstram, a grande importância do sistema
10 imune para o controle das NICs. Segundo Bosch *et al.*, (1997), o desenvolvimento e a
11 progressão das lesões cervicais demonstra um déficit local ou geral da imunovigilância, o
12 que favorece a evolução das NICs, porém quando ocorre regressão das lesões cervicais,
13 não se sabe que tipo de resposta imunológica é induzida. Já foi observado, que em
14 indivíduos imunocompetentes, o período de evolução entre uma lesão pré-invasivas e o
15 câncer é maior, quando comparado a indivíduos imunossuprimidos (NICOLAU, 2000), e
16 que maioria das mulheres imunocompetentes, conseguem desenvolver uma resposta imune
17 efetiva que evita o desenvolvimento do carcinoma cervical (PEREYRA, GUERRA &
18 VILLA, 2004).

19 Há evidências de que a imunidade local é mais importante e eficiente, que a
20 sistêmica, para controlar a infecção pelo HPV e o desenvolvimento das NICs. Pois,
21 pacientes com deficiência de imunidade celular apresentam frequência aumentada para o
22 desenvolvimento de lesões cervicais (PETRY *et al.*, 1994; ELLERBROCK *et al.*, 2000).

1.1- Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) & Neoplasia Cervical Invasiva

1 As neoplasias invasivas do colo uterino são em geral precedidas por uma longa fase
2 de doença pré-invasiva. Pela análise microscópica, vários eventos celulares ocorrem que
3 vão caracterizar as progressão das neoplasias cervicais, estes vão desde a atipia celular e a
4 graus variados de displasia antes de chegar ao carcinoma invasivo. Um bom conhecimento
5 da fisiopatologia e alterações morfofoculares das NICs podem auxiliar nos diagnósticos
6 colposcópicos, citológicos e anatomopatológicos, além de facilitar compreensão dos
7 princípios do tratamento dessas lesões (SELLORS & SANKARANARAYANAN, 2004).

8 O conceito e a caracterização das lesões pré-neoplásicas do colo uterino iniciou ao
9 fim do século XIX, quando foram observadas amostras teciduais da cérvix que
10 apresentavam áreas de alterações epiteliais atípicas adjacentes às áreas invasivas
11 (WILLIAM, 1888). A terminologia carcinoma *in situ* (CIS) foi utilizado pela primeira vez
12 em 1932 por Broders, para indicar aquelas lesões em que as células atípicas e
13 indiferenciadas ocupavam a toda a espessura do epitélio, sem romper a membrana basal.
14 Posteriormente a essas observações, é que se verificou a associação entre o carcinoma *in*
15 *situ* e a neoplasia invasiva. E somente no final dos anos 50 é que o termo displasia foi
16 utilizado para designar a atipias no tecido epitelial cervical que se mostravam
17 intermediárias entre o epitélio normal e o carcinoma *in situ* (REAGAN *et al.*, 1953). A
18 displasia foi classificada em três diferentes graus – leve moderada e grave – dependendo da
19 espessura do epitélio que se mostra alterada. Após alguns anos, as NICs também passaram
20 a serem referidas de acordo com os graus de intensidade das atipias celulares (SELLORS
21 & SANKARANARAYANAN, 2004).

22 Um sistema de nomenclatura em classes foi criado a partir de vários estudos de
23 acompanhamentos citológicos, colposcópicos e histológicos, de pacientes com lesões

1 cervicais, porém este se tornou cada vez mais arbitrário, porque alguns casos de displasia
2 regrediam, alguns persistiam e outros progrediam, então conseguiram verificar que essas
3 lesões são decorrentes de várias alterações patológicas contínuas no epitélio normal que faz
4 com que este evolua a lesões pré-neoplásicas e destas ao câncer cervical. Contudo, os
5 estudos permitiram uma maior compreensão sobre o processo de evolução das lesões, pois,
6 conseguiram estabelecer uma correlação direta entre o grau de comprometimento da
7 espessura do epitélio cervical com a progressão das lesões. Com base nos dados
8 supracitados, Richart em 1986, sugeriu que o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC)
9 fosse utilizada para indicar uma variedade de atipia celular, porém, limitada à espessura do
10 epitélio. Com isso, a NIC foi dividida em graus I, II e III. A NIC I correspondia ao mesmo
11 grau de comprometimento da displasia leve, a NIC II ao da displasia moderada e a NIC III
12 à displasia grave e carcinoma *in situ* (MAGGI *et al.*, 1989).

13 Na década de 80 algumas alterações celulares observadas com frequência em cortes
14 histológicos de lesões cervicais, tal como a coilocitose ou atipia coilocítica, foi associada à
15 infecção do papilomavírus humano. Coilócitos são células atípicas resultantes dos efeitos
16 citopatológicos dos vírus HPVs sobre as células infectadas. Essa alteração é caracterizada
17 por um halo ou auréola perinuclear com bordas bem delimitadas, a presença desta alteração
18 já caracteriza uma infecção por HPV, portanto, a coilocitose é um efeito patognômico do
19 vírus nas células hospedeiras. Estas descobertas propiciaram na próxima década, a criação
20 de um sistema de classificação histológica simplificada em dois graus da lesão: NIC de
21 baixo grau que incluía anomalias compatíveis a com atipia coilocítica e lesões de NIC I e
22 NIC de alto grau que compreendia a NIC II e III. Dessa forma, as lesões caracterizadas de
23 alto grau foram consideradas como sendo as precursoras da neoplasia invasiva (RICHART,
24 1990). No ano de 1988, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos realizou um
25 simpósio para tentar padronizar nomenclatura para os diagnósticos de citopatologia

1 cervical (Relatório do Simpósio de NIC, 1989; SOLOMON, 1989; KURMAN *et al.*,
2 1991). Após três anos, um novo encontro foi realizado, e as sugestões e as observações
3 destes dois simpósios ficaram conhecidas como Terminologia do Sistema de Bethesda
4 (TSB) (Relatório do Simpósio de NIC, 1992).

5 A criação da Terminologia do Sistema de Bethesda foi baseada em dados
6 citológicos, porém pode também ser usado para caracterização de cortes histológicos, pois
7 agora se passou a incluir ao grau da lesão (baixo ou alto) o tipo de epitélio (escamoso),
8 então a partir do simpósio de 1991, foi instituído o termo: lesão intraepitelial escamosa
9 (SIL), sendo esta nomenclatura dividida em duas classes de acordo com o grau da lesão:
10 lesões de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) (KURMAN *et al.*, 2004).

11 A classificação de TBS também inclui alterações coilocíticas e NIC de baixo grau
12 (NIC I) em LSIL, enquanto a HSIL compreendem NIC mais avançada, como NIC II e III.
13 O termo lesão se manteve, pois as alterações citopatológicas e morfológicas, não
14 necessariamente indicam ou identifica um processo neoplásico (KURMAN *et al.*, 1994).

15 Em 2001, uma nova reunião de Bethesda foi realizada, e mais alterações foram
16 realizadas na TSB (SOLOMON *et al.*, 2002; EVANS, *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2006). A
17 principal modificação em relação às células escamosas alteradas ocorreu com a divisão do
18 termo ASCUS. A idéia era criar uma terminologia universal das alterações ocorridas no
19 colo uterino, porém sem deixarem de incluir algumas alterações citológicas atípicas, ou
20 seja, possuem alterações reativas (atípias) que fazem lembrar ao mesmo tempo alteração
21 encontras em LSIL. Estas células foram caracterizadas em duas novas subcategorias: a
22 ASC-US (atípias de células escamosas de significado indeterminado) e a ASC- H (atipia de
23 células escamosas não podendo excluir lesão de alto grau) (SHERMAN *et al.*, 2006; LEE
24 *et al.*, 2006). Segundo Souza *et al.*, (2004), as células atípicas de significado indeterminado
25 tem importância clínica quando seguida então da letra H, indicativa de suspeita de HSIL.

1 Permaneceram os termos: LSIL (compreendendo displasia leve/NIC I e alterações
2 celulares associadas ao HPV) e HSIL (displasia moderada/NIC II, displasia severa,
3 carcinoma *in situ*/NIC III) (SOLOMON *et al.*, 2002).

1. 2 - Citocinas & Perfil de Resposta Imune

4 Uma das descobertas mais brilhantes na imunologia foi a identificação de
5 subconjuntos de células TCD4⁺, T auxiliar ou T helper (Th) que diferem nas citocinas que
6 produzem e nas suas funções efetoras. Estes subconjuntos são atualmente constituídos de:
7 Th1, Th2, Th3 (atualmente T regulatório - Treg ou supressor) e Th17 (ZHU & PAUL, 2008)
8 (Figura 1).

9 Os subconjuntos mais bem definidos de células T efetoras da linhagem auxiliar
10 CD4⁺ são as células Th1 e Th2. As células Th1 podem mediar respostas imunes contra
11 patógenos intracelulares (MOSMANN & COFFMAN, 1989; PAUL & SEDER, 1994). Nos
12 seres humanos, desempenham um papel particularmente importante na resistência a
13 infecções por micobactérias. As células Th1 são também responsáveis pela indução de
14 algumas doenças auto-imunes. As principais citocinas produzidas são: IFN- γ , linfotóxina α
15 (LT α), IL-10 (ZHU & PAUL, 2008) e IL-2 (Figura 1), sendo o IFN- γ a citocina de
16 identificação do perfil de células Th1. O IFN- γ ativa macrófago e IL-2 estimula o
17 crescimento de células T antígeno-específico, resultando em doença mais branda ou cura
18 (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008; ZHU & PAUL, 2008).

19 As células Th2 medeiam a defesa contra parasitas extracelular, incluindo helmintos
20 (MOSMANN & COFFMAN, 1989; PAUL & SEDER, 1994; ABBAS, LICHTMAN &
21 PILLAI, 2008; ZHU & PAUL, 2008). Elas são importantes na indução e persistência da
22 asma e outras doenças alérgicas. As células Th2 produzem : IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13,

1 IL-25, e anfiregulina, sendo que a IL-4 e IL-5 são as citocinas que definem o perfil de
2 células Th2 (ZHU & PAUL, 2008; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008) (Figura 1). A
3 IL-4 estimula a produção de IgE e ambas, IL-4 e IL-10 estimulam células B e inibem
4 ativação de macrófago, resultando em infecção progressiva (SIELING & MODLIN, 1994).

5 As citocinas produzidas por esses subconjuntos de células T não somente
6 determinam as suas funções efetoras, mas também participam do desenvolvimento e
7 expansão dos respectivos subconjuntos. Por exemplo, o IFN- γ secretado pelas células Th1
8 promove a diferenciação adicional de Th1. Contrariamente, a IL-4 produzida por células
9 Th2 promove a diferenciação de Th2, e a IL-10 também produzida pelo perfil Th2 (bem
10 como por outras células), inibe a ativação das células Th1. Assim, cada subconjunto
11 amplifica a si mesmo e promove regulação cruzada do subconjunto recíproco. Por essa
12 razão, uma vez que a resposta imunológica se desenvolve ao longo de uma via, ela se torna
13 cada vez mais polarizada naquela direção, e a polarização mais extrema é vista nas
14 infecções crônicas ou na exposição crônica a antígenos, quando a estimulação imune é
15 persistente (CHIEPERS *et al.*, 2005; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008).

16 Os subconjuntos Th1 e Th2 se desenvolvem dos mesmos precursores, que são os
17 linfócitos T CD4⁺ *naïves*, e o padrão de diferenciação é determinado por estímulos presentes
18 logo no início da resposta imune. O mais importante estímulo de indução da diferenciação é
19 constituída pelas citocinas, como o IFN- γ e a IL-12 sendo os principais indutores de células
20 do perfil Th1, e a IL-4, de células Th2 (TRINCHIERI & SHER, 2007; ZHU & PAUL,
21 2008).

22 A descoberta das células Th1/Th2 induziu os pesquisadores a abandonar o conceito
23 dos T supressores. Portanto, supressão era o resultado da atividade de citocinas contra-
24 reguladoras ou inibitórias (SHEVACH, 2000).

1 No final dos anos 90, as células T supressoras ressurgem como células T
2 reguladoras (Treg) quando várias subpopulações de células T foram identificadas com a
3 habilidade de inibir a proliferação de outras células (NAGLER-ANDERSON *et al.*, 2004).

4 As células Treg constituem 5-10% do total populacional de células T CD4⁺ em
5 camundongos e em seres humanos e estão principalmente envolvidas na repressão de
6 doenças auto-imunes (AKBAR *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004; WEI, MORRIS &
7 KONG, 2004; WANG, 2006; YAMAGUCHI & SAKAGUCHI, 2006; ZHU & PAUL,
8 2008) (Figura 1). Estas células são constitutivamente caracterizadas pela expressão da
9 proteína transmembrana CD25 que é a cadeia α do receptor da interleucina-2 (IL-2);
10 CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) e FOXP3 (*forkhead transcription factor*)
11 (AKBAR *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004; WEI, MORRIS & KONG, 2004; WANG,
12 2006; YAMAGUCHI & SAKAGUCHI, 2006; ZHU & PAUL, 2008).

13 O FOXP3 é considerado o marcador mais específico das células Treg. É um
14 membro da família *forkhead* de fatores transcripcionais que está criticamente envolvido no
15 desenvolvimento e função das células Treg CD25⁺ (WANG *et al.*, 2007; ZHU & PAUL,
16 2008). No câncer humano, a expressão do FOXP3 está sendo usualmente correlacionada
17 com um curso desfavorável da doença. Dessa forma, talvez, essa expressão possa
18 representar, no futuro, uma variável prognóstica independente em termos de sobrevida
19 geral e sobrevida livre da doença (ZHENG & RUDENSKY, 2007). A importância dos
20 marcadores das células Treg no carcinoma de células escamosas ainda não tem sido
21 determinada (ZHU & PAUL, 2008).

22 A geração de células T reguladoras foi proposta para explicar o mecanismo de
23 autotolerância atribuído ao timo (SAKAGUCHI, 1996).

24 O mecanismo de regulação do sistema imune pelas células Tregs é pouco
25 entendido. Os estudos não chegaram a um simples modo de ação. A maioria dos estudos

1 tem concluído que Treg (LTCD4⁺CD25⁺) suprime por um mecanismo dependente de
2 contato entre as células (ERMANN *et al.*, 2001), que é independente de citocinas
3 (SHEVACH, 2002).

4 O envolvimento de uma molécula ligada à superfície das Treg, tem sido proposto.
5 Tal molécula tem sido identificada como sendo a CTLA-4 (NISHIMURA *et al.*, 2004;
6 COOLS *et al.*, 2007), esta molécula inibi a ativação de células T por se ligar às moléculas
7 co-estimulatórias como a B7.1 e B7.2 (VENCE *et al.*, 2007; ABBAS, LICHTMAN &
8 PILLAI, 2008).

9 Segundo Lima (2006), para que ocorram mecanismos ou respostas
10 imunossupressoras, é necessário que ocorra a ativação do TCR ou CD3 das células T
11 reguladoras. Porém, experimentos *in vitro* mostraram que a presença de células
12 apresentadoras de antígeno não é requerida para que ocorra supressão, mas o autor acredita
13 que as citocinas possuem alguma importância nesse mecanismo.

14 Tregs são capazes de produzir IL- 10 (ANNACKER *et al.*, 2001; ZHU & PAUL,
15 2008), TGF- β e IL-35 (ZHU & PAUL, 2008) (Figura 1). A produção de IL-10 pelas
16 células T reguladoras é necessária para supressão de certas formas de inflamação auto-
17 imune intestinal (SURI-PAYER & CANTOR, 2001). Outro mecanismo dependente de
18 contato celular, é a supressão pelo fator de crescimento transformador- β (TGF- β)
19 (LEVINGS *et al.*, 2002), esta citocina induz expressão de FOXP3 (ZHU & PAUL, 2008),
20 e a contínua expressão desse fator é importante para a manutenção da atividade supressora
21 das células Treg (WILLIAMS & RUDENSKY, 2007).

22 Com relação ao envolvimento de TGF- β na imunossupressão, há evidências de que
23 a supressão de células T CD8⁺ possa induzir mecanismos de auto-imunidade ou rejeição a
24 tumores, e para que isso ocorra é necessário que tenha um receptor de TGF- β na célula T

1 CD8⁺ (GREEN *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2005). Assim, a inibição de linfócitos T CD8⁺ é
2 dependente de TGF- β (LIMA, 2006).

3 O TGF- β também desempenha um papel importante na diferenciação e manutenção
4 de células Treg. Tanto TGF- β quanto IL-2, são necessários para a sobrevivência e funções
5 das Tregs, mesmo após a diferenciação dessas (ZHU & PAUL, 2008).

6 Baixa concentração de TGF- β pode induzir a diferenciação em Th17, já à indução
7 de FOXP3 requer altas concentrações dessa citocina. Assim, a quantidade de TGF- β , bem
8 como a presença ou ausência de citocinas pro-inflamatórias determina o balanço ou
9 equilíbrio entre a expressão de ROR γ t e FOXP3, e, portanto, se o perfil de resposta imune
10 será TH17 ou Treg (ZHU & PAUL, 2008).

11 Dois trabalhos independentes mostraram que células reguladoras humanas são
12 capazes de induzir, por contato, propriedades supressoras em células T CD4⁺CD25⁻,
13 quando cultivadas *in vitro* (SEVACH, 2002). Houve uma tolerância às infecções, depois
14 que as Tregs CD4⁺CD25⁺ começaram a produzir TGF- β (JONULEIT *et al.*, 2002) ou IL-
15 10 (DIECKMANN *et al.*, 2002).

16 Vários estudos demonstram que as células Treg têm capacidade para suprimir
17 diferentes membros da resposta imune celular. Especificamente, Treg tem sido responsável
18 por inibir a proliferação e produção de citocinas de células T CD4⁺ *náive* ativadas, bem
19 como de células Th1 (CHAPUT, 2007; VAN der BURG *et al.*, 2007). Outros estudos
20 mostram a capacidade das células Treg em inibir a ativação de células T CD8⁺ pela não
21 expressão da molécula CD25 e pela inibição da produção da IL-2 (PICCIRILLO &
22 SHEVACH, 2001).

23 Zhou & Levitsky (2007) consideram importante o fato das Tregs CD4⁺
24 contribuírem para a tolerância tumoral antígeno-específica. No câncer cervical, a

1 oncoproteína E6 age como um antígeno-específico para a geração de células Treg CD4+
2 (VAN DER BURG *et al.*, 2007).

3 Estudos recentes identificaram um quarto subconjunto de células TCD4⁺ efectoras
4 diferenciadas inicialmente em camundongos. Estas células foram chamadas de células
5 Th17, porque a citocina que elas secretam e caracteriza-as é a IL-17 (IL-17a e IL-17f),
6 além de também de secretarem IL-10, IL-21 e IL-22 (Figura 1) (ABBAS, LICHTMAN &
7 PILLAI, 2008; ZHU & PAUL, 2008).

8 Células Th17 mediam respostas imunes contra bactérias e fungos extracelulares
9 (WEAVER *et al.*, 2006; ZHU & PAUL, 2008). Elas são responsáveis ou participam, na
10 indução de muitos órgãos específicos de doenças auto-imunes, reações inflamatórias ricas
11 em neutrófilos. Assim, as células do perfil Th17 podem ser importantes mediadores de dano
12 tecidual em doenças inflamatórias imunomediadas (ZHU & PAUL, 2008; ABBAS,
13 LICHTMAN & PILLAI, 2008) (figura 1).

14 As células Th17 não produzem IFN- γ ou IL-4, pois sua diferenciação a partir de
15 células T CD4⁺ *naïves* é inibida pela presença dessas citocinas, indicando que as células
16 Th17 são realmente um subconjunto exclusivo e distinto das células Th1, Th2 e Treg (ZHU
17 & PAUL, 2008).

18 A diferenciação de células T CD4⁺ *naïves* em Th17, ocorre por estímulo do
19 antígeno na presença de TGF- β juntamente com IL-1, IL-6 e outras citocinas pró-
20 inflamatórias como a IL-21 e IL-23 (Figura 1). A fonte do TGF- β na diferenciação é
21 desconhecida. Acredita-se que a IL-23 está estreitamente relacionada à IL-12 que induz
22 Th1, o que promove a sobrevivência e manutenção das células Th17 diferenciadas.
23 Curiosamente, TGF- β sozinho estimula o desenvolvimento de células T reguladoras, assim
24 essa citocina é capaz de promover respostas pró-inflamatórias (Th17) ou protetoras

1 (células T reguladoras), dependendo de que outras citocinas estejam presentes no ambiente
 2 (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008; VOLPE *et al.*, 2008).

3 Segundo Zhu & Paul (2008), os subtipos mais bem caracterizados são: Th1, Th2 e
 4 células T regulatórias (Treg), cuja diferenciação depende de fatores de transcrição como:
 5 T-bet, STAT-4 e STAT-1 para Th1, GATA-3 e STAT-5 e 6 para Th2 e FOXP3 e STAT-5
 6 para Treg. Para as células do perfil Th17 os fatores de transcrição são: ROR γ t e STAT-3
 7 (Figura 1).

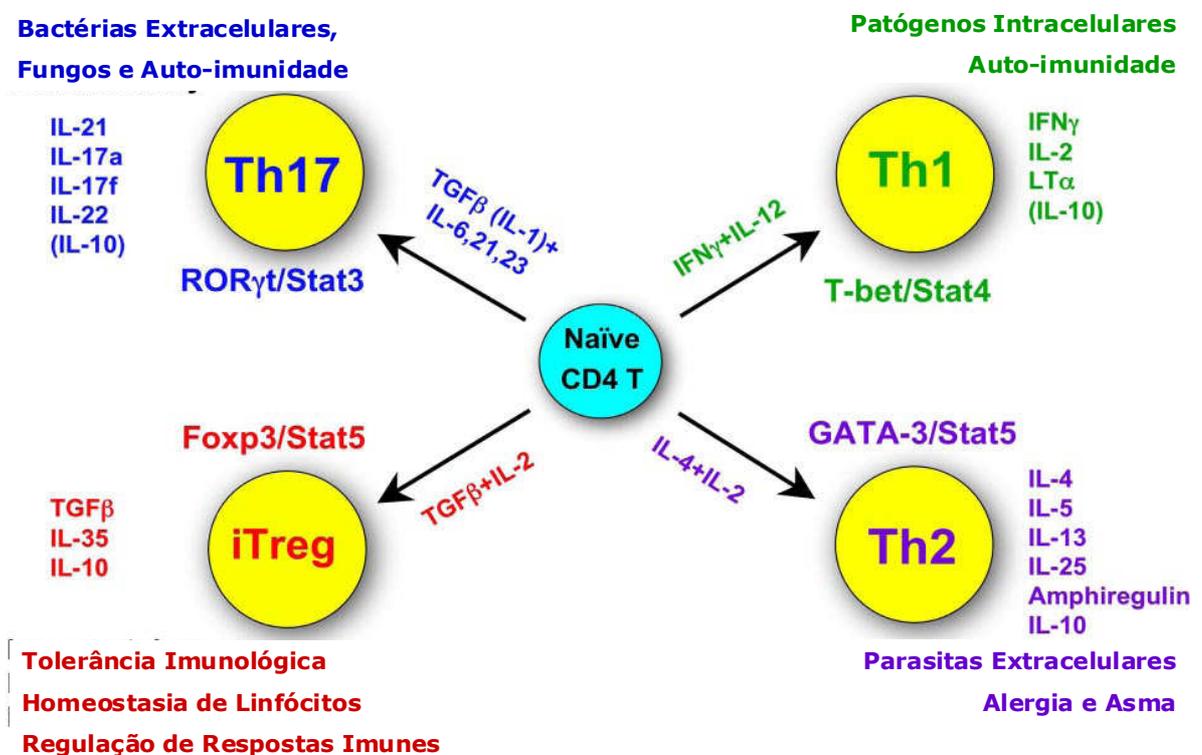


Figura 1: Resumo dos 4 perfis de resposta imune derivados da diferenciação de células T CD4⁺ naíve: citocinas produzidas características de cada perfil, citocinas que induzem a diferenciação dos perfis e fatores de transcrição críticos para a determinação do perfil imunológico (Adaptado de ZHU & PAUL, 2008).

1.3 – Perfil de Resposta Imune nas Lesões Cervicais

8 Um importante componente da resposta imune inata consiste nas células
 9 fagocíticas. O recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e monócitos para o

1 sítio da infecção é mediado pela liberação de citocinas e quimiocinas do tecido infectado
2 (AL-SALEH *et al.*, 1998). Zur Hausen (1986) tem descrito um sistema de sobrevivência
3 intracelular nas infecções persistentes por HPV. A hipótese é que o câncer cervical resulta
4 de uma deficiência no controle celular da expressão dos genes do HPV, e que o controle
5 normal é mediado por fatores liberados por macrófagos.

6 Vários estudos descrevem que macrófagos estão aumentados em infecções por
7 HPV ou NIC (AL-SALEH *et al.*, 1998) e no carcinoma cervical (DAVIDSON *et al.*, 1997)
8 e que estas células estão presentes em ambos, epitélio e estroma, sendo capazes de
9 fagocitar células transformadas por HPV-16 (BANKS *et al.*, 1991). Corroborando com esta
10 idéia, papilomas que apresentam regressão têm um infiltrado significativo de macrófagos
11 que coram positivamente pela imunohistoquímica para TNF- α e isto correlaciona com
12 apoptose das células epiteliais infectadas (HAGARI *et al.*, 1995).

13 A linhagem de células NK também foram encontradas no estroma de NIC (TAY *et*
14 *al.*, 1987) e podem ser ativadas pelo tratamento com citocinas para produzir células NK
15 ativadas por linfocinas (LAK). Células epiteliais são imortalizadas por HPV-16 e linhagens
16 de células de carcinoma cervical são relativamente resistentes às células NK, mas sensíveis
17 à lise por células LAK (FUBERT-HARRIS *et al.*, 1989; WU *et al.*, 1996).

18 A lise de células infectadas com HPV, pelas células NK é deficiente em pacientes
19 que tem lesões pré-cancerosas ou câncer induzido pelo vírus, segundo Malejczyk *et al.*
20 (1989). As proteínas E6 e E7 do HPV-16 inibem a habilidade das células NK a produzir
21 IFN em ensaios *in vitro* (LEE *et al.*, 2001). Estes dados indicam que a infecção por HPV
22 poderia ser controlada por resposta eficiente das células NK.

23 Sabe-se que a grande maioria das infecções virais é eliminada por meio de
24 respostas imunes mediadas por células. As células apresentadoras de antígeno têm um

1 papel importantíssimo na indução de todas as respostas imunológicas dependentes de
2 células T. Os papilomavírus humanos são patógenos responsáveis pelo desenvolvimento de
3 tumores benignos e malignos do tecido epitelial escamoso e glandular. Há estimativas de
4 que aproximadamente 20% dos casos de câncer em humanos estejam associados a certos
5 tipos de vírus como o: vírus Epstein-Barr, vírus tipo 1 da leucemia de células T,
6 papilomavírus humano, e o vírus da hepatite B e C (FLINT *et al.*, 2000).

7 Porém, só recentemente, as células dendríticas (DCs) começaram a ser relacionadas
8 a tumores malignos de difícil diagnóstico, comportamento agressivo e resposta terapêutica
9 desfavorável, que se apresentavam tanto na forma de tumores sólidos como de leucemias
10 (FERRANTINI *et al.*, 2008).

11 As Dcs estão relacionadas a diversas alterações de natureza proliferativa,
12 neoplásica e imunoinflamatórias. Tem sido demonstrado que as DCs não são recrutadas ou
13 ativadas em alguns tumores humanos e que a sua função poderia estar comprometida pelo
14 tumor, ou mediadores secretados pelo tumor com o intuito de suprimir a resposta imune.
15 Dados recentes revelam que as DCs poderiam ter um papel central na apresentação de
16 antígenos tumorais e a eficiência deste processo poderia determinar a eficácia da resposta
17 anti-tumoricida (FONG & ENGLEMAN, 2000; BALLESTRERO *et al.*, 2008). Um
18 aspecto importante das DCs é a habilidade dessas células em processar e apresentar
19 antígenos peptídicos tumor-relacionado que é a base primária para o reconhecimento
20 imune de células tumorais (TIMMERMAN & LEVY 1999; GILBOA, 2007).

21 Alguns pesquisadores conseguiram verificar em cobaias, uma associação à
22 regressão de lesões cervicais à melhora da resposta imune mediada por células. Em lesões
23 de alto grau pode haver uma regressão espontânea, que está correlacionada com os
24 mecanismos efetores da imunidade mediada por células. Na neoplasia cervical invasiva
25 verificaram que os linfócitos infiltrantes no tumor são predominantemente linfócitos T

1 citotóxicos, (LT CD8⁺) (WANG *et al.*, 2003). Mcdevitt (2000) identificaram CTLs
2 específicos contra oncoproteínas do HPV no sangue periférico de pacientes com câncer
3 cervical e neoplasias intraepiteliais cervicais. Mas a persistência viral está relacionada à
4 resposta imune do hospedeiro, especialmente na ausência de resposta linfoproliferativa em
5 resposta à infecção (UNG *et al.*, 1999), pois também foram identificadas células T
6 citotóxicas específicas para HPV-16, no sangue periférico de mulheres que não
7 apresentavam lesões cervicais.

8 A resposta imunológica individual é influenciada por diversos fatores endógenos e
9 exógenos, dentre os quais os polimorfismos dos antígenos do sistema de
10 histocompatibilidade, o estado nutricional, tabagismo e outros (PARDO-GOVEA *et al.*,
11 2005). A secreção de citocinas na mucosa cervical também é influenciada por esses fatores
12 e podem interferir na história natural da infecção pelo HPV (GRAVITT *et al.*, 2003;
13 SCOTT *et al.*, 2006). Em uma análise multivariada, níveis elevados de IFN- γ , IL-10 e IL-
14 12 foram significativamente ($p < 0,05$) associados a várias variáveis, incluindo a infecção
15 ativa pela *Chlamidia trachomatis*, relação sexual recente e uso de anticoncepcional oral.
16 Níveis diminuídos de IL-4 e IL-10 foram associados com consumo de cigarro nas últimas
17 24 horas (SCOTT *et al.*, 2006).

18 Gonçalves & Donadi (2004), ao avaliar a resposta imune celular em pacientes que
19 tinha infecção pelo HPV de baixo risco e lesões cervicais, observaram um predomínio de
20 citocinas do perfil Th1, sendo que essas ativam LT citolíticas, contribuindo, portanto, para
21 a eliminação da infecção e regressão das lesões. Essas células podem ser encontradas no
22 sangue periférico, mas a presença, retenção e função dessas, são observadas
23 preferencialmente, intra e/ou peritumoral. A persistência ou eliminação da infecção pelo
24 HPV, associadas à regressão das NICs são ainda pouco compreendidas. Entretanto, a

1 relação entre a resposta imunológica e o *clearance* da infecção viral ainda é pouco
2 explorada.

3 A infecção pelo HPV é exclusivamente intraepitelial. Teoricamente, o HPV só é
4 reconhecido pelas APCs profissionais do epitélio escamoso, as Células de Langerhans
5 (LCs), as quais são consideradas células dendríticas intraepiteliais (POPPE *et al.*, 1996; DE
6 VILLIERS *et al.*, 2004). Segundo Stanley, 2008, o capsídeo viral é quem ativa as DCs,
7 mas há indícios de que as LCs não são ativadas na presença do capsídeo do HPV. Células
8 de Langerhans, quando incubadas com a proteína recombinante L1-VLPs (Vírus-Like
9 particles) do HPV 16, não é iniciada uma resposta imune epitopo-específica contra a L1,
10 portanto VLP é um tolerógeno. Em contraste, as DCs estromais, são ativadas pela VLP e
11 estimulam resposta imune por células T específicas, mas como o vírus permanece no
12 epitélio, a probabilidade de encontrar DCs estromais é baixa, e evidentemente, as chances
13 de uma resposta imune eficaz contra o vírus será mínima.

14 Uma característica da infecção por HPV é a ausência de resposta inflamatória.
15 Estudos recentes sugerem que alguns produtos gênicos do HPV poderiam bloquear
16 diretamente a atividade dos mediadores inflamatórios. A proteína E6 do HPV-16 inibe a
17 expressão de IL-18, uma citocina proinflamatória (CHO *et al.*, 2001) e liga-se
18 competitivamente ao receptor da IL-18 (LEE *et al.*, 2001). Esta mesma proteína do vírus
19 liga-se também ao receptor do TNF- α e protege as células do apoptose (FILIPPOVA *et al.*,
20 2002).

21 Apesar da infecção por HPV não induzir prontamente a resposta imune aguda, a
22 expressão e liberação de citocinas proinflamatórias específicas como IL-1, TNF- α , IL-12,
23 IL-10 e TGF- β estão aumentadas durante o NIC III e o câncer cervical invasivo (TJIONG
24 *et al.*, 2001; WEI *et al.*, 2001). Em oposição a estes achados, células de carcinoma cervical
25 e células imortalizadas por HPV *in vitro* possuem uma redução das citocinas

1 proinflamatórias (WOODWOTH *et al.*, 1993; MERRICK *et al.*, 1996). O que demonstra
2 claramente que o microambiente é de fundamental importância para liberação destes
3 fatores.

4 Há vários estudos onde é observado um paradigma entre os perfis de resposta
5 imune Th1/Th2. Alguns trabalhos realizados com pacientes que apresentavam lesões
6 cervicais de baixo, alto grau, ou neoplasia invasiva sugerem que níveis diminuídos de
7 citocinas Th1 e aumentados de Th2 estão associados a progressão da lesão. Mas há vários
8 trabalhos na literatura com resultados variados e às vezes controversos. A produção de IL-
9 2 em NICs diminuiu com aumento do grau da neoplasia (TSUKUI *et al.*, 1996). Além
10 disso, desvio do padrão Th1 (IL-2 e IFN- γ) para o Th2 (IL-4 e IL-10) foi associado com a
11 progressão da lesão e conseqüentemente, a um pior prognóstico para pacientes (CLERICI
12 *et al.*, 1997; CLERICI *et al.*, 1998). Entretanto, a polarização em direção ao padrão Th2
13 parece facilitar a progressão tumoral, pois, haverá uma redução ou um bloqueio, por parte
14 das citocinas, na resposta imune celular favorecendo e ativando a imunidade humoral
15 (MOTA *et al.*, 1999). Estudos relacionaram a regressão das verrugas genitais e das
16 neoplasias cervicais com o padrão Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α). Porém, baixos níveis de
17 IFN- γ foram associados ao desenvolvimento do câncer cervical com pior prognóstico
18 (TARTOUR *et al.*, 1998).

19 Rafiq *et al.* (2001), sugerem que a IL-10 bloqueia síntese de citocinas
20 imunoestimulatórias das células Th1, produzidas pelos monócitos e células NK ativados,
21 porém a diminuição da atividade das células NK pode ser devida à reativação ou re-
22 infecção pelo HPV.

23 Lee *et al.* (2004) demonstraram mulheres como diagnóstico de HSIL apresentaram
24 diminuição acentuada na produção de citocinas do perfil Th1, sugerindo que também pode
25 ter ocorrido um comprometimento na função citolítica das células T CD8+.

1 Regressão da infecção por HPV está associada a uma resposta imune, mediada por
2 citocinas do tipo Th1 (GRASSEGGER *et al.*, 1997) que é caracterizada por um massivo
3 infiltrado de células mononucleares, regulação positiva de moléculas de adesão, e apoptose
4 de queratinócitos infectados, sugerindo que este perfil de resposta imune tem um
5 importante papel na defesa do hospedeiro (EVANS *et al.*, 1997). Em contraste, lesões por
6 HPV persistentes não exibem inflamação e podem desenvolver tolerância. O
7 desenvolvimento da NIC tem sido associada a um padrão TH2 de secreção de citocinas e
8 que a proporção IL-12/IL-10 está reduzida (CLERICI *et al.*, 1997; EL-SHERIF *et al.*,
9 2001) e as citocinas imunossupressivas tais como TGF- β e IL-10 estão aumentadas
10 (TJIONG *et al.*, 2001; ZITVOGEL, TESNIERE & KROEMER, 2006).

11 Scott *et al.*, (1999) observaram que o padrão de resposta imunitária do tipo Th1
12 ocorre através da expressão de IFN- γ e IL-2, e está associado à presença do HPV no tecido
13 cervical. Al-Saleh *et al.*, (1998) demonstraram que a progressão de NICs para câncer está
14 associada a uma resposta imunoregulatória do tipo Th2 com a participação de IL-4 e IL-6.
15 Wu *et al.*, (1996) em estudos *in vitro*, demonstraram que o TNF- α , o IFN- γ e a IL-2 tem
16 um papel crítico na regulação da susceptibilidade dos queratinócitos cervicais na infecção
17 pelo HPV em pacientes com NIC II e III.

18 Tem sido descrito que, as respostas imunes na presença do HPV, tem um
19 predomínio de citocinas imunoinibitórias ou supressoras, sendo que estas podem estar na
20 região cervical ou na circulação periférica, sendo que a presença dessas propicia um
21 ambiente favorável para transformações malignas, permitindo assim a progressão das NICs
22 para o câncer cervical (AHMED *et al.*, 2002).

23 A presença de lesões malignas e pré-malignas a nível tissular pode originar uma
24 infiltração de células do sistema imune, juntamente com as células do próprio tecido,
25 iniciando uma resposta ao processo de infecção do HPV. Estes tipos celulares podem estar

1 representados por linfócitos e monócitos/macrófagos (LONGWORTH & LAIMINS,
 2 2004). A resposta imunitária no local da lesão pode ser do tipo Th1, que inclui a
 3 interleucina-2 (IL-2), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o interferon gama (IFN- γ),
 4 do tipo Th2 estão presentes as interleucinas: IL-4, IL-5, IL- 6, IL-9, IL-10, IL-13 ou ambas
 5 (PARDO-GOVEA *et al.*, 2005). Segundo Pardo-Govea *et al.*, (2005), em pacientes com
 6 lesões pré-cancerosas infectadas ou não com HPV, há um predomínio da resposta Th1.

7 Alguns dos resultados dos estudos relatados acima e outros não descritos, foram
 8 sumarizados na tabela 1, onde fica evidente a grande contradição entre os diversos
 9 resultados encontrados na literatura.

Tabela 01: Citocinas relacionadas com a Neoplasia Intraepitelial Cervical e Infecção pelo HPV

Resposta Imune	Citocina	Ação	Referência
Th1	↓Th1	Predisposição às lesões de alto grau	Lee <i>et al.</i> , 2004
Th2	↓TNF	Susceptibilidade à persistência viral	Kirckpatrick <i>et al.</i> , 2004
Th2	↑IL-10	Progressão da lesão cervical	Fernandes <i>et al.</i> , 2004
Th1	↓IFN- γ	Progressão da lesão cervical associada ao HPV	El Sherif <i>et al.</i> , 2001
Th2	↑IL-10	Progressão da lesão cervical associada ao HPV	Stanczuk <i>et al.</i> , 2001
Th1	↑ IL-2, IFN- γ , TNF ↓ IFN- γ	Regressão de verrugas genitais Pior prognóstico CC	Tartour <i>et al.</i> ,1998
Th2	↑IL-4, IL10	Pior prognóstico em pacientes com NIC e HPV	Clerici <i>et al.</i> ,1997
Th1	↓IL-2, IFN		
Th1	IL-2	Produção diminui com a progressão da lesão	Tsukui <i>et al.</i> ,1996
Th2	IL-10	Reativação de infecção latente pelo HPV	Garzetti <i>et al.</i> ,1996

Fonte: Linsingen (2008).

10 A imunidade celular mediada por células T tem papel crucial na erradicação das
 11 células infectadas pelo HPV. Falhas na indução ou manutenção da resposta das células T

1 podem levar à infecção persistente e ao desenvolvimento de neoplasias malignas
2 (STIEPCICH, 2000; ZHU & PAUL, 2008).

3 Há diversos mecanismos de escape dos HPVs, um deles pode ser a indução de
4 citocinas imunossupressoras como: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, principalmente no
5 microambiente tumoral, levando ao comprometimento da atividade das células T
6 principalmente as citotóxicas, e a inibição de apresentação de antígenos (PARDO-GOVEA
7 *et al.*, 2005).

8 Segundo KIM *et al.*, (1995), células infectadas pelos tipos de HPV de alto risco
9 parecem estar modificadas no câncer cervical em relação à resposta humoral e celular
10 efetuadas pelas citocinas IL-10, IL-2, IL-6 e IL-8, TNF- α , TGF- β , configurando um dos
11 mecanismos de evasão da resposta imune mediada por células T. Parece que, nos estágios
12 precoces do desenvolvimento do carcinoma espinocelular ocorre uma polarização da
13 expressão de citocinas do padrão Th1 (IFN- γ), enquanto que nos estágios avançados do
14 tumor, com acentuada capacidade metastática, a polarização se desvia para o perfil Th-2
15 (IL-4 e IL-5) (AGARWAL *et al.*, 2003). Entretanto, todos esses eventos celulares e
16 humorais da resposta imune ao vírus são muito pouco estudados, necessitando ainda, de
17 uma investigação mais detalhada.

18 Há diminuição na expressão das moléculas de HLA de classe I e diminuição da
19 expressão das cadeias dos receptores de células T (TCRs), que prejudicam o processo de
20 apresentação de antígenos das células hospedeiras às células T e diminuem o
21 reconhecimento imunológico dos linfócitos T citotóxicos do hospedeiro às células
22 infectadas pelo HPV. Ocorre também aumento da expressão das moléculas de HLA de
23 classe II, com provável ativação de linfócitos T supressores CD4⁺ CD25⁺, que inibem os
24 linfócitos T citotóxicos (PARDO-GOVEA *et al.*, 2005).

1 Recentemente, verificou-se que em vários tipos de cânceres é gerado um
2 microambiente tumoral por causa da repressão ou a expressão de diferentes genes como:
3 Fas, Fas ligante, citocinas e quimiocinas, importantes na resposta imune e de células
4 tumorais. Citocinas imunossupressoras também são produzidas no local do tumor, o que
5 favorece a progressão do processo neoplásico (GIANNINI *et al.*, 1998).

6 Considerando que algumas citocinas possuem efeito ou função pleiotrópica, é
7 difícil determinar a participação de uma citocina em particular na progressão do câncer.
8 Isso se deve a relação com outras citocinas, fatores de crescimento e hormônios, que atuam
9 simultaneamente no local do tumor, assim como os leucócitos (NASH *et al.*, 1999).

10 Existem dois mecanismos que podem explicar a participação das citocinas no
11 desenvolvimento de câncer. 1) É possível que as citocinas favoreçam o desenvolvimento
12 tumoral ao interagir com fatores de proliferação tumoral, induzir a atividade de
13 angiogênese tumoral, e promover a metástase, pelo aumento da adesão celular. 2) As
14 citocinas como mediadores da resposta imune podem inibir a expressão de moléculas e
15 receptores, tanto das células da resposta imune como das células tumorais, que estão
16 envolvidos na identificação e destruição de células tumorais (tais como desregulação das
17 moléculas de MHC Classe I e II moléculas co-estimuladoras e a desregulação da cadeia
18 zeta do complexo TCR/CD3) (MATSUDA *et al.*, 1994; REICHERT *et al.*, 1998;
19 TAYLOR *et al.*, 2003).

20 Sabe-se, portanto, que algumas citocinas podem ou não favorecer o
21 desenvolvimento das Neoplasias Intraepitelial Cervicais induzidas (NICs) por HPV,
22 através da modulação da imunidade do hospedeiro ou precipitação da inflamação crônica,
23 contudo, a importância do estudo é justificada pela ausência de elucidação do papel da
24 resposta imunológica nas lesões causadas pelo HPV/NIC e as possíveis alterações na
25 resposta imune a esta neoplasia (NICs).

2- Objetivos

2.1 – Objetivos Gerais:

1 Os objetivos gerais desse trabalho foram:

- 2 1- Traçar o perfil imunológico de pacientes com NIC em diferentes graus (LSIL e
3 HSIL) e Carcinoma Invasivo, através da expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α ,
4 IL-2, IL-12, IL-4, IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, utilizando a técnica da
5 RT-PCR;
- 6 2- Comparar o perfil de resposta imune local, das pacientes com NIC/Invasivo com
7 os pacientes controles;

2.2 – Objetivos Específicos:

8 Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- 9 1- Analisar as citocinas expressas nos diferentes graus de lesões: Lesão Intraepitelial
10 Escamosa de Baixo Grau (LSIL) que relaciona com infecção por HPV e NIC I,
11 Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) que relaciona com NIC II e
12 NIC III e no Carcinoma Invasivo;
- 13 2- Determinar as citocinas expressas nas amostras controles;
- 14 3- Comparar as citocinas expressas das amostras NICs/Invasivos com as amostras
15 controles;
- 16 4- Agrupar as citocinas estudadas em perfis de respostas imunes: Th1, Th2 e T
17 regulatório (Treg) e correlacioná-las com aquelas expressas nas amostras NICs /
18 Invasivos e controles;

- 1 5- Determinar o perfil de resposta imune no local, a partir das biópsias coletadas e
- 2 consequentemente com a expressão de citocinas local.

3 - Pacientes & Métodos

3.1 – Casuística

1 O estudo foi realizado em grupos de mulheres que apresentaram neoplasia
2 intraepitelial cervical (NIC) induzida ou não pelo HPV, mas não possuindo outras co-
3 infecções, atendidas no serviço de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do
4 Triângulo Mineiro, sob a responsabilidade do Instituto de Pesquisa em Oncologia -
5 IPON/Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia - DGO

6 Foram coletados fragmentos de biópsias do colo uterino de cento e seis pacientes
7 que apresentavam algum tipo de lesão intraepitelial cervical: NIC I (LSIL), NICII e NIC
8 III (HSIL) ou Carcinoma e/ou Adenocarcinoma invasivo (Invasivo). O grupo controle foi
9 composto por 20 (100%) mulheres sem infecção pelo HPV/NICs, submetidas à
10 histerectomia por diagnóstico de leiomioma, sendo a citologia oncológica (papanicolaou) e
11 colposcopia normais.

12 As pacientes inclusas no estudo foram todas voluntárias e informadas sobre o
13 propósito da pesquisa e somente foram admitidas àquelas que concordaram e assinaram o
14 termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1), devidamente aprovado pelo comitê
15 de ética da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Os critérios para inclusão das
16 pacientes no estudo foram:

- 17 a) Paciente imunocompetente;
- 18 b) Ausência de sangramento durante o exame;
- 19 c) Não utilização de antibióticos orais, fungicidas ou cremes vaginais durante os 30
20 dias anteriores;
- 21 d) Nenhuma atividade sexual por pelo menos dois dias antes do dia da coleta das

- 1 amostras;
- 2 e) Nenhuma história prévia de tratamento para HPV.

3.2 - Métodos Clínicos

3 Inicialmente, foram anotadas informações sobre idade, hábitos e condições de vida
4 (tabagismo, idade de sexarca, idade da primeira gestação, paridade, número de parceiros),
5 métodos contraceptivos usados e história de doenças sexualmente transmissíveis.

3.3 - Coleta do Material

6 A biópsia foi realizada com pinça de Gaylor-Medina somente na presença de zona
7 transformação anormal pela colposcopia e inclusa em 1,0 mL de Trizol (Invitrogen™ life
8 Technologies, Carlsbad, Califórnia, USA), armazenado em freezer a - 20°C para posterior
9 extração do RNA, DNA e proteínas, conforme protocolo do fabricante de Trizol.

3.4 - Extração de RNA

10 As amostras inclusas em Trizol foram submetidas à sonicação por aproximadamente 30
11 minutos por 50 Watts em temperatura ambiente para a decomposição da arquitetura da
12 peça. Após este processo, o Trizol das amostras sonicadas foi todo aspirado e transferido
13 para um novo eppendorf estéril, ficando somente a parte da peça que não se decompôs no
14 tubo anterior.

15 Neste novo tubo, foi realizada a separação das fases adicionando 200 µL de
16 clorofórmio para cada 1,0 mL de Trizol inicialmente adicionado à amostra, com posterior

1 agitação em vórtex por 15 segundos, incubação a temperatura ambiente por 3 minutos e
2 centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, a mistura se separa
3 em 3 fases: fase incolor aquosa onde se encontra o RNA (porção superior), uma fase
4 intermediária onde encontramos as proteínas e outra fase chamada de vermelho-fenol-
5 clorofórmio, onde se encontra o DNA. A fase aquosa foi então transferida para outro tubo,
6 para inicialmente ser feita a extração do RNA, e as outras fases foram armazenadas para
7 posterior extração de DNA e proteína.

3.5 - Obtenção do RNA

8 No tubo com fase aquosa foi adicionado 500µL de álcool isopropílico e incubado
9 por 10 minutos a temperatura ambiente seguida pela centrifugação a 12.000 x g por 15
10 minutos a 4°C. O RNA então foi precipitado no fundo do tubo.

11 A fase aquosa foi desprezada e o RNA foi lavado duas vezes com 1,0 mL de
12 Etanol 75%, com posterior homogeneização e centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a
13 4°C, a cada lavagem. O sobrenadante foi desprezado, deixando secar o RNA do tubo em
14 geladeira por aproximadamente 12 horas.

15 Após a secagem completa do RNA, este foi diluído em 11 µL de água milli Q
16 DEPC para posterior realização da RT-PCR como descrito no item 3.6.

3.6 - Transcrição Reversa de RNA para cDNA

17 O RNA extraído das amostras foi submetido à síntese de DNA complementar
18 (cDNA), que consiste na transformação da fita simples de RNA para fita dupla de cDNA,

1 técnica conhecida por RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction)
 2 utilizando reagentes da Invitrogen life Technologies, como deoxiribonucleotídeos
 3 trifosfatados (dNTP = dATP, dGTP, dCTP e dTTP), *primer* oligo dt (*primers* formados por
 4 12-18 resíduos de deoxitimidina, especificamente desenhados para síntese de longos
 5 cDNAs a partir de mRNAs com cauda poli-A. Os *primers* se anelam na junção da cauda
 6 poli-A da fita de mRNA eliminando assim a transcrição da região poli-A, propiciando uma
 7 síntese do cDNA mais eficaz), DTT (1, 4-Dithiothreitol), tampão 5x e enzima Superscript.

8 O RNA seco em geladeira, inicialmente foi re-suspendido em 11 µL de água milli
 9 Q tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). Posteriormente, foi preparada uma mistura de
 10 substâncias (mix) para a realização da transcrição reversa também chamada de RT-PCR. O
 11 volume final de cada foi de 13 µL, sendo que esta solução foi composta por:

12 *Primer* Oligo dt -----1µL
 13 RNA-----11 µL
 14 dNTP-----1 µL

15

16 As amostras foram levadas para o termociclador para o primeiro ciclo da
 17 transcrição reversa. Este ciclo foi composto por uma etapa de desnaturação a 65°C por 5
 18 minutos, seguida de uma etapa de resfriamento a 16°C por tempo indeterminado. Após este
 19 procedimento, foi adicionada a cada amostra 7µL de outro mix contendo:

20 Tampão Kit 5x-----4 µL
 21 DTT 0,1 M-----1 µL
 22 Enzima Superscript IIIrt---1 µL
 23 Água DEPC-----1 µL

24

25 Sendo, portanto, agora o volume final de 20 µL. A enzima responsável pela

1 transformação do RNA em c-DNA (transcrição reversa) foi a Superscript IIIrt[®] First-
2 Standart System Synthesis for RT-PCR – Invitrogen[®].

3 As amostras foram submetidas a novas etapas de incubação no termociclador
4 sendo essas: 5 minutos a 25°C, seguida de incubação por 60 minutos a 50°C. A reação foi
5 inativada a 70°C por 15 minutos.

6 Após o término da RT-PCR, foram pipetados 5 µL de cada amostra para um novo
7 tubo eppendorf e adicionado a essas 495 µL de água DEPC, sendo que estas ficaram numa
8 diluição de 1: 100. Essas amostras foram quantificadas em espectrofotômetro específico
9 para quantificação de RNA/cDNA, DNA e proteínas, e posteriormente descartadas. A
10 leitura das amostras foi realizada a uma absorbância de 320 nm e fator 50. Para cada
11 amostra, foram anotada durante a quantificação, a concentração do cDNA em µg/mL, a
12 concentração de proteína em mg/mL e a absorbância em nm. Para cada amostra, foram
13 feitos os cálculos necessários para a diluição ou não dessas com o objetivo de deixá-las em
14 uma concentração final de 1 µg/µL.

3.7 - Protocolo da RT-PCR para as Citocinas

15 Os *primers* e as reações de PCR foram feitos seguindo o protocolo de Tripathy,
16 Chauhan & Nityanand (2004), descritos no quadro 1, porém as temperaturas de anelamento
17 assim como os mixes para cada *primers*, as etapas e número de ciclos para a realização das
18 PCRs foram otimizadas por prévias padronizações realizadas no Instituto de Pesquisa em
19 Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

20 De modo geral, o cDNA foi adicionado a uma solução contendo os seguintes
21 componentes para amplificação: Tampão 10x, dNTP, MgCl₂, Taq DNA polimerase,
22 *Primer F* 10 µM, *Primer R* 10 µM e água de injeção. Porém, as concentrações dos

1 reagentes: dNTP, MgCl₂, Taq e primers de cada citocina variaram de acordo com a
2 padronização otimizada de cada primer (Anexos 2).

3 Para a realização da PCR com os primers de: β -actina, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12,
4 IL-10 e IL-4 foi utilizado 1 μ L de cDNA de cada amostra, e para os primers de TGF- β 1,
5 TGF- β 2 e TGF- β 3, foram utilizados 2 μ L de cDNA de cada amostra, sendo, portanto, a
6 concentração final das amostras no mix de 100 ng e 200 ng, respectivamente (Anexos 2).

Quadro 1: Características dos indicadores sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos de c-DNA após padronização.

<i>Citocina</i>	<i>Seqüências</i>	<i>Temperatura de Anelamento</i>	<i>Tamanho do produto amplificado</i>
TGF-β1	(F): ACC AAC TAT TGC TTC AGC TC (R): TTA TGC TGG TTG TAC AGG	55°C	198 pb
TGF-β2	(F): CTG TCC CTG CTG CAC TTT TGT (R): TCT TCC GCC GGT TGG TCT GTT	60,4°C	227 pb
TGF-β3	(F): CCT TTC AGC CCA ATG GAG AT (R): ACA CAG CAG TTC TCC TCC AA	61,2°C	241 pb
IFN-γ	(F): TCT GCA TCG TTT TGG GTT CTC (R): TCA GCT TTT CGA AGT CAT CTC	55°C	321 pb
IL-4	(F): CCT CTG TTC TTC CTG CTA GCA (R): GCC GTT TCA GGA ATC GGA TCA	56°C	300 pb
IL-10	(F): ACA GCT CAC CAC TGC TCT GT (R): AGT TCA CAT GCG CCT TGA TG	58°C	327 pb
β-actina	(F): CAC TCT TCC AGC CTT CCT TCC (R): CGG ACT CGT CAT ACT CCT GCT T	64°C	311 pb
TNF-α	(F): GAG TGA CAA GCC TGT AGC CCA TGT TGT AGC (R): GCA ATG ATC CCA AAG TAG ACC TGC CCA GAC T	73°C	444 pb
IL-2	(F): ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT T (R): GTC AGT GTT GAG ATG ATG CTT TGA C	66°C	457 pb
IL-12	(F): AGT GTC AAA AGC AGC AGA GG (R): AAC GCA GAA TGT CAG GGA G	66°C	363 pb

3.8 – Ciclos de Amplificação das RT-PCRs para Citocinas

1 Para o cDNA a reação foi iniciada com uma desnaturação a 94°C por 5 minutos,
2 seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento dos *primers*
3 *sense e anti-sense* a temperatura específica para cada primers como mostra o quadro 1 por
4 40 segundos e a extensão a 72°C por 45 segundos, seguindo de uma etapa final de extensão
5 a 72°C por 10 minutos e resfriamento a 16°C por tempo indeterminado.

3.9 - Detecção dos Produtos Amplificados

6 Após a reação de PCR, os produtos da amplificação tanto do cDNA quanto do
7 DNA, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e corados com
8 nitrato de prata a 2%. Utilizamos em cada gel um padrão de peso molecular de 50 pb,
9 como controle positivo, o TrackitTM 1kb DNA ladder da Invitrogen[®].

10 Cada amostra a ser aplicada no gel foi homogeneizada com o auxílio de uma
11 micropipeta e 10,0 µL da amostra de cDNA amplificado foi misturada a 5,0 µL de tampão
12 da amostra. Esta mistura foi realizada com cada uma das amostras submetidas à PCR e
13 foram aplicadas uma em cada orifício do gel de poliacrilamida 10%. O gel foi submetido a
14 uma corrente de 90 volts por 2 horas.

15 Posteriormente a corrida eletroforética, o gel foi colocado em solução fixadora por
16 20 minutos, esta solução foi desprezada e em seguida adicionada ao gel uma solução de
17 nitrato de prata por 20 minutos sob agitação mecânica, seguido de uma lavagem rápida em
18 água milli-Q e incubação em solução reveladora por aproximadamente 20 minutos,
19 retornando o gel para a solução fixadora. Após a revelação dos géis, foi realizada a análise
20 da presença das bandas de amplificação nos mesmos.

4 - Análise Estatística

1 Para análise estatística foi elaborado um banco de dados eletrônico. As variáveis foram
2 analisadas através do programa Graph Pad Prism versão 4.0. As proporções foram
3 comparadas através do teste do Qui-quadrado. As diferenças foram consideradas
4 estatisticamente significantes quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade
5 foi menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$).

5- Resultados

5.1 - Amostras Coletadas

1 Em nosso estudo, foram colhidas biópsias de 106 pacientes atendidas no Serviço
 2 de Ginecologia e Obstetícia, sob a responsabilidade do Instituto de Pesquisa em Oncologia
 3 - IPON/Disciplina de Ginecologia e Obstetícia – DGO, do Ambulatório Maria da Glória da
 4 UFTM, sendo que essas tinham diagnóstico de Lesões Intraepitelial Escamosa de Baixo
 5 (LSIL), ou Alto Grau (HSIL), ou Carcinoma ou Adenocarcinoma invasivo (Anexos 3). O
 6 grupo controle foi composto de 20 pacientes com resultados de citologia oncológica normal,
 7 que foram submetidas à histerectomia por leiomioma (Tabela 1) (Anexos 3).

8 As 126 amostras coletadas foram divididas em 4 grupos (Tabela 2) após a
 9 confirmação por estudo anatomopatológico:

- 10 1) Grupo LSIL (NIC I - Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau) = 28 amostras;
- 11 2) Grupo HSIL ((NIC II ou III - Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau) = 53
 12 amostras;
- 13 3) Grupo Invasivos (Carcinoma e Adenocarcinoma invasivo) = 25 amostras;
- 14 4) Grupo Controle (Normal) = 20 amostras.

Tabela 1: Distribuição das pacientes com lesão e o grupo controle atendidas na Ginecologia do Ambulatório Maria da Glória - UFTM.

Grupo	n (%)
LSIL/ HSIL / Invasivos	106 (100)
Controle	20 (100)
Total	126 (100)

Tabela 2: Distribuição das amostras coletadas em três diferentes grupos de lesões cervicais.

<i>Amostras</i>	<i>N Total</i>	<i>%</i>
<i>LSIL</i>	28/106	26,42 %
<i>HSIL</i>	53/106	50%
<i>INVASIVOS</i>	25/106	23,58%
TOTAL	106/106	100%

1 As pacientes do grupo controle tinham idades entre 30 a 60 anos, com média e
2 desvio padrão de $48,6 \pm 7,89$ anos, (Intervalo de confiança de 95 % variando entre 44,91
3 anos e 52,29 anos) (Tabela 3), sendo a faixa etária mais freqüente entre 41 a 50 anos, com
4 10/20 (50%) pacientes (Tabela 3).

5 No grupo de pacientes com lesão intraepitelial cervical, a idade variou entre 16 e
6 78 anos, com média e desvio padrão de $35,20 \pm 13,31$ anos (Intervalo de confiança de 95%
7 variando entre 32,50 anos e 37,90 anos) (Tabela 4). Na tabela 4 pode-se observar a
8 distribuição das pacientes com lesões em faixas etárias, sendo que as faixas etárias de 16 a
9 26 anos e 27 a 37 anos, apresentaram um maior número de pacientes, 31/106 (29,25%) e
10 29/106 (27,36%), respectivamente.

11 A tabela 5 mostra a distribuição da faixa etária das pacientes do grupo LSIL, sendo
12 a faixa etária mais freqüente entre: 27 a 37 anos (9/28; 32,14%) com média 31,33 anos
13 desvio padrão de $\pm 2,0$ anos, e 38 a 48 anos (8/28; 28,57%) com média e desvio padrão de
14 41,5 anos $\pm 3,82$ anos.

15 O grupo das pacientes com diagnósticos de HSIL também apresentaram maior
16 freqüência na faixa etária de 27 a 37 anos (21/53; 39,62%) com média e desvio padrão de
17 $31,81 \pm 2,50$ anos, respectivamente (Tabela 6), já o grupo das pacientes com lesões
18 invasivas do colo uterino, tiveram uma maior freqüência na faixa etária de 38 a 48 anos

- 1 (7/25; 28%) com média e desvio padrão de 42,0 anos \pm 3,65 anos, respectivamente (Tabela 2 7).

Tabela 3: Distribuição da faixa etária das pacientes do grupo controle atendidas no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia Maria da Glória - UFTM.

Faixa Etária (anos)	N (%)	X \pm DP (anos)
30 - 40	5/20 (25)	39,2 \pm 1,95
41 - 50	10/20 (50)	47,7 \pm 3,16
51 - 60	5/20 (25)	56,8 \pm 2,95
Total	20/20 (100)	48,6 \pm 7,89

Tabela 4: Distribuição da Faixa etária das pacientes com lesão intraepitelial cervical atendidas no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia Maria da Glória - UFTM.

Faixa Etária (anos)	N (%)	X \pm DP (anos)
16 - 26	31/106 (29,25)	21,87 \pm 3,54
27 - 37	29/106 (27,36)	31,76 \pm 2,61
38 - 48	21/106 (19,81)	43,62 \pm 2,99
49 - 59	10/106 (9,43)	52,1 \pm 3,54
60 - 70	3/106 (2,83)	64 \pm 4,00
71 - 80	2/106 (1,89)	75,5 \pm 3,54
TOTAL	106/106 (100)	35,20 \pm 13,31

Tabela 5: Distribuição da frequência da faixa etária no grupos das pacientes com LSIL.

Faixa Etária (anos) LSIL	N (%)	X ± DP (anos)
16 – 26	7/28 (25)	18,71 ± 2,06
27 - 37	9/28 (32,14)	31,33 ± 2,00
38 – 48	8/28 (28,57)	41,5 ± 3,82
49 - 59	2/28 (7,14)	49,5 ± 0,71
60 - 70	1/28 (3,57)	68 ± 0
71 - 80	1/28 (3,57)	73 ± 0
TOTAL	28/28 (100)	32,43 ± 13,28

Tabela 6: Distribuição da frequência da faixa etária no grupos das pacientes com HSIL.

Faixa Etária (anos) HSIL	N (%)	X ± DP (anos)
16 – 26	15/53 (28,30)	22,67 ± 3,22
27 - 37	21/53 (39,62)	31,81 ± 2,50
38 – 48	11/53 (20,75)	42,63 ± 3,36
49 - 59	4/53 (7,55)	53 ± 4,24
60 - 70	1/53 (1,89)	64 ± 0
71 - 80	1/53 (1,89)	78 ± 0
TOTAL	53/53 (100)	33,57 ± 11,52

Tabela 7: Distribuição da frequência da faixa etária no grupos das pacientes lesão invasiva do colo uterino.

Faixa Etária (anos)	N (%)	X ± DP (anos)
Invasivo		
16 – 26	4/25 (16)	24 ± 2,55
27 - 37	5/25 (20)	33,40 ± 3,05
38 – 48	7/25 (28)	42 ± 3,65
49 - 59	5/25 (20)	51,8 ± 3,56
60 - 70	4/25 (16)	65,5 ± 4,44
TOTAL	25/25 (100)	41,92 ± 14,70

5.2 - Citocinas Avaliadas

1 Todas as 126 amostras foram submetidas à RT-PCR para análise da síntese das
 2 citocinas: IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. Para
 3 verificar a qualidade do c-DNA utilizado como amostra foi avaliada a expressão do gene
 4 da proteína beta actina (β -actina). Todas as 126 amostras analisadas no presente estudo
 5 mostraram-se positivas para β -actina (Anexos 4).

5.2.1 – Citocinas expressas pelo Grupo Controle

6 A expressão de citocinas pela RT-PCR mostrou que: 6/20 (30%) apresentaram-se
 7 positivas para IL-2, 12/20 (60%) para IL-12, 1/20 (5%) para IFN- γ , 14/20 (70%) TNF- α ,
 8 2/20 (10%) IL-4 e 2/20 (10%) para TGF- β 2 (Tabela 8 e Gráfico 1).

1 Quando comparamos as citocinas expressas nesse grupo entre elas, a análise
 2 estatística mostrou que houve diferença estatisticamente significante entre as citocinas: IL-
 3 2 e: TNF- α (p=0,0114), IFN- γ (p=0,0375), IL-10 (p=0,0004), TGF- β 1 (p=0,0079) e TGF-
 4 β 3 (p=0,0079). Entre a IL-12 e: IFN- γ (p=0,0002), IL-4 (p=0,0009), TGF- β 1 (p<0,0001),
 5 TGF- β 2 (p=0,0009) e TGF- β 3 (p<0,0001). Ao compararmos o TNF- α , observamos que
 6 este também apresentou diferença estatística em relação ao: IFN- γ (p<0,0001), IL-4
 7 (p=0,0001), TGF- β 1 (p<0,0001), TGF- β 2 (p=0,0001) e TGF- β 3 (p<0,0001). O IFN- γ
 8 mostrou diferença quando comparado ao IL-10 (p<0,0001). A IL-10 mostrou diferença
 9 estatisticamente significante entre: IL-4 (p<0,0001), TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3
 10 (p<0,0001) (Tabela 8; Anexos 5).

Tabela 8: Citocinas positivas no Grupo Controle.

		Citocinas Positivas								
<i>Amostras</i>	N	IL-2	IL-12	TNF- α	IFN- γ	IL-10	IL-4	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
	Total	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Controles	20/20 (100)	6/20 (30)	12/20 (60)	14/20 (70)	1/20 (5)	17/20 (85)	2/20 (10)	0/20 (0)	2/20 (10)	0/20 (0)

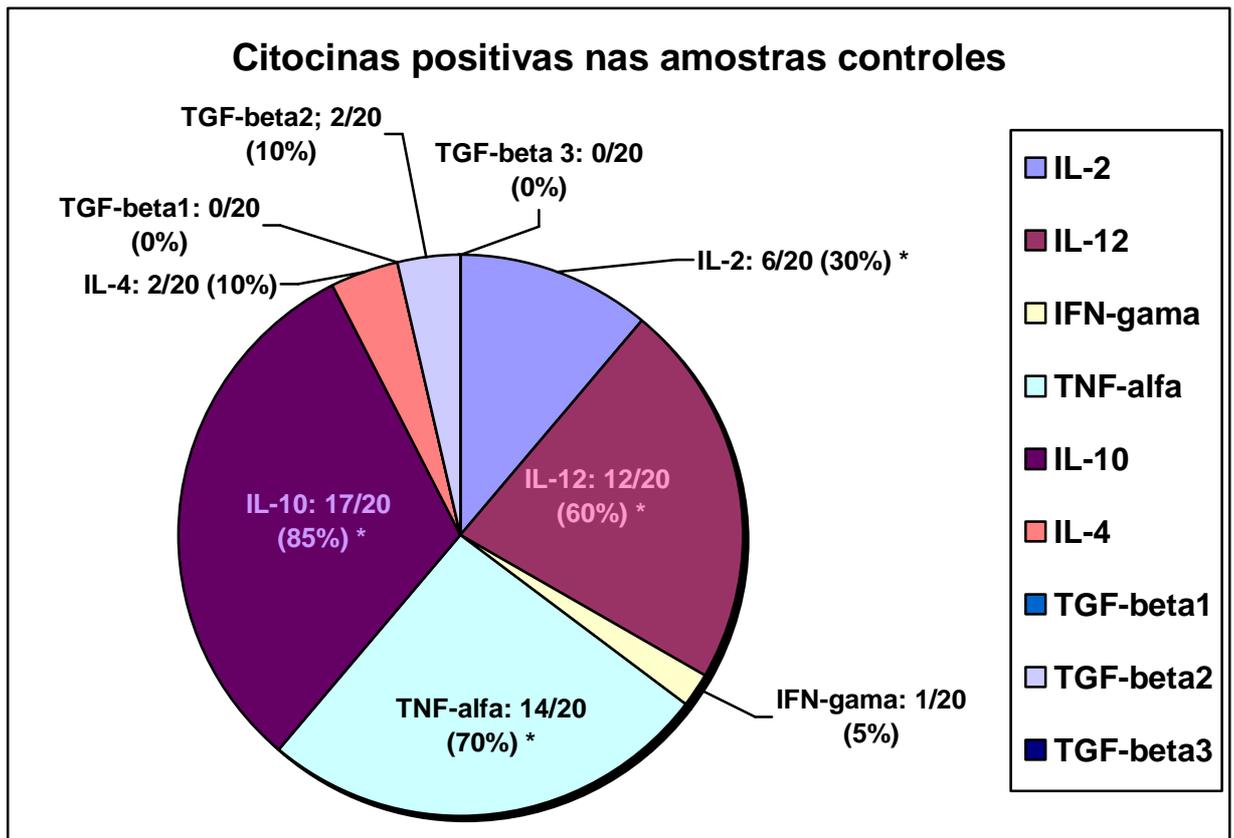


Gráfico 1: Citocinas positivas nas amostras controles (* $p \leq 0,05$).

5.2.2 – Citocinas expressas pelo Grupo de Pacientes com Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL)

1 Das 106 (100%) amostras coletadas de pacientes com lesões induzidas pelo HPV,
 2 28 (26,42%) apresentaram Lesões Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL). Dessas
 3 28 (26,42%) pacientes com diagnóstico de LSIL 3/28 (10,71%) apresentaram positivas
 4 para IL-2, 7/28 (25%) para IL-12, 9/28 (32,14%) para TNF- α , 6/28 (21,43%) IFN- γ , 19/28
 5 (67,86%) IL-10, 10/28 (35,71%) IL-4, 11/28 (39,29%) TGF- β 1, 14/28 (50%) TGF- β 2 e
 6 5/28 (17,86%) TGF- β 3 (Tabela 9 e gráfico 2).

7 A análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre as citocinas:
 8 IL-2 quando comparada com: IL-10 ($p < 0,0001$), IL-4 ($p = 0,0267$), TGF- β 1 ($p = 0,0136$) e
 9 TGF- β 2 ($p = 0,0014$). Entre IL-12 comparada com: IL-10 ($p = 0,0013$) e TGF- β 2 ($p = 0,0500$);

1 O TNF- α obteve diferença apenas quando comparado com a IL-10 ($p=0,0075$).
 2 Apresentaram também diferença estatística quando comparamos o IFN- γ com: a IL-10
 3 ($p=0,0005$) e TGF- β 2 ($p=0,0257$). Ao compararmos a IL-10 obtivemos diferença
 4 estatística entre: a IL-4 ($p=0,0161$), TGF- β 1 ($p=0,0321$) e TGF- β 3 ($p=0,0002$). O TGF- β 2
 5 teve diferença estatística quando comparada com o TGF- β 3 ($p=0,0111$) (Tabela 9)
 6 (Anexos 5).

Tabela 9: Citocinas Expressas pelas pacientes do Grupo LSIL

		Citocinas Positivas								
Amostras	N	IL-2	IL-12	TNF- α	IFN- γ	IL-10	IL-4	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
	Total	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
LSIL	28/106 (26,42)	3/28 (10,71)	7/28 (25)	9/28 (32,14)	6/28 (21,43)	19/28 (67,86)	10/28 (35,71)	11/28 (39,29)	14/28 (50%)	5/28 (17,86)

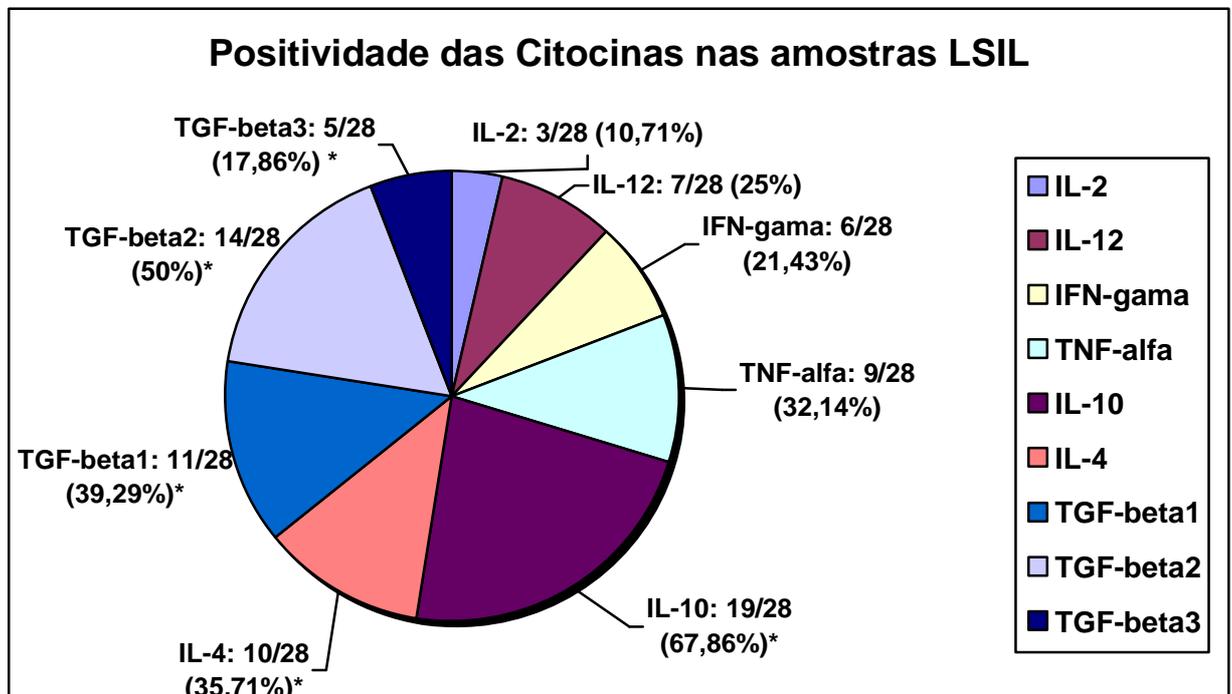


Gráfico 2: Distribuição da positividade das citocinas avaliadas no estudo em relação ao grupo de pacientes com LSIL ($p \leq 0,05$).

5.2.3 – Citocinas expressas pelo Grupo de Pacientes com Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL)

1 Neste grupo somaram 53 mulheres com diagnóstico de lesões de alto grau, que
 2 representaram 50% (53/106) das amostras coletadas. Dessas 53 amostras com HSIL: 14/53
 3 (26,42%) apresentaram positividade para IL-2, 22/53 (41,51%) para IL-12, 27/53 (50,94%)
 4 TNF- α , 8/53 (15,09%) IFN- γ , 39/53 (73,58%) IL-10, 14/53 (26,42%) IL-4, 25/53
 5 (47,17%) TGF- β 1, 30/53 (56,60%) TGF- β 2 e 16/53 (30,19%) para o TGF- β 3 (Tabela 10 e
 6 Gráfico 3).

7 A análise estatística das citocinas positivas neste grupo mostrou que houve
 8 diferença significativa entre as citocinas: IL-2 comparado com TNF- α ($p=0,0095$), IL-10
 9 ($p<0,0001$), TGF- β 1 ($p=0,0267$) e TGF- β 2 ($p=0,0016$). Ao compararmos a IL-12 com as
 10 outras citocinas, observamos que houve diferença estatística entre o TNF- α ($p=0,0095$),
 11 IFN- γ ($p=0,0025$) e IL-10 ($p=0,0008$). Já o TNF- α , obteve diferença quando comparado:
 12 ao IFN- γ ($p<0,0001$), a IL-10 ($p=0,0162$), a IL-4 ($p=0,0095$) e com o TGF- β 3 ($p=0,0296$).
 13 Ao compararmos o IFN- γ , obtivemos diferença estatística em relação: a IL-10 ($p<0,0001$),
 14 ao TGF- β 1 ($p=0,0004$) e TGF- β 2 ($p<0,0001$). Observamos diferença estatística ao
 15 compararmos a IL-10 com: a IL-4 ($p<0,0001$), o TGF- β 1 ($p=0,0054$) e TGF- β 3
 16 ($p<0,0001$). A IL-4 mostrou diferença estatística quando comparada como: o TGF- β 1
 17 ($p=0,0267$) e TGF- β 2 ($p=0,0016$). O TGF- β 2 mostrou diferença estatística quando
 18 comparado com o TGF- β 3 ($p=0,0061$) (Tabela 10) (Anexos 5).

Tabela 10: Citocinas Expressas pelas pacientes do Grupo HSIL

		Citocinas Positivas								
Amostras	N Total	IL-2 (%)	IL-12 (%)	TNF- α (%)	IFN- γ (%)	IL-10 (%)	IL-4 (%)	TGF- β 1 (%)	TGF- β 2 (%)	TGF- β 3 (%)
HSIL	53/106 (50)	14/53 (26,42)	22/53 (41,51)	27/53 (50,94)	8/53 (15,1)	39/53 (73,58)	14/53 (26,42)	25/53 (47,17)	30/53 (56,60)	16/53 (30,19)

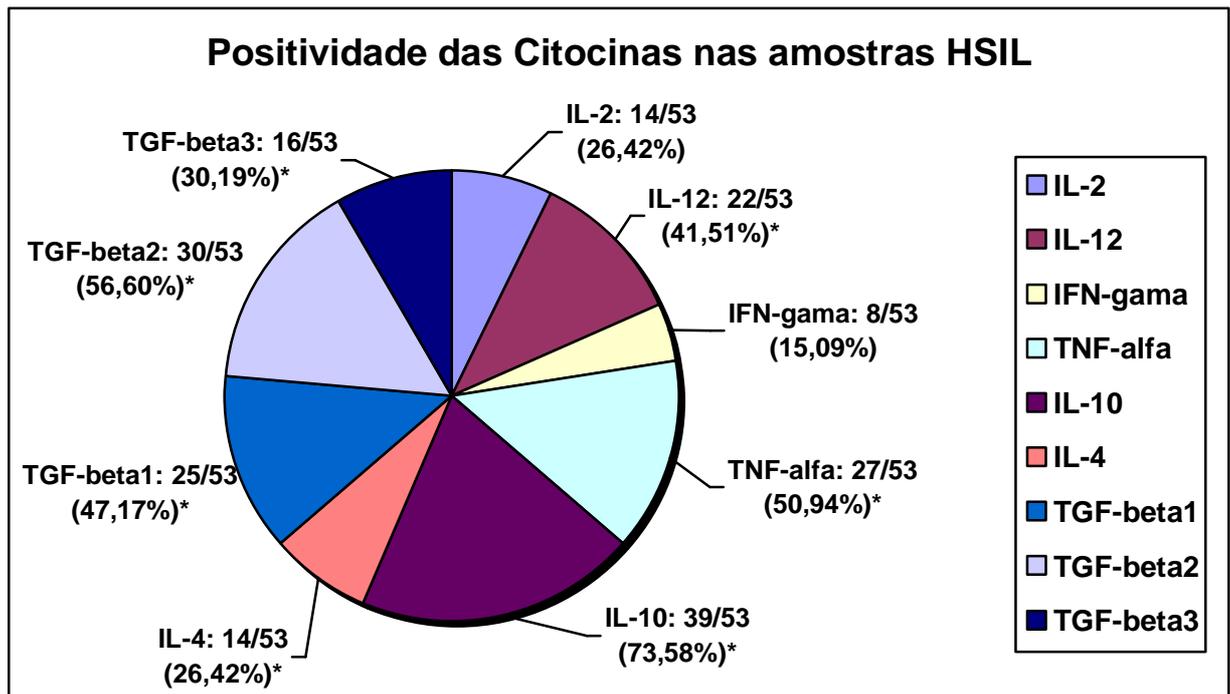


Gráfico 3: Positividade e porcentagem das citocinas em relação às amostras HSIL ($p \leq 0,05$).

5.2.4 – Citocinas expressas pelo Grupo de Pacientes com Lesões Invasivas

1 Fizeram parte desse grupo 25 (23,58%) mulheres, a análise da expressão das
 2 citocinas mostrou que 4/25 (16%) delas eram positivas para IL-2, 5/25 (20%) para IL-12,
 3 3/25 (12%) TNF- α , 7/25 (28%) IFN- γ , 23/25 (92%) IL-10, 6/25 (24%) IL-4, 12/25 (48%)
 4 TGF- β 1, 17/25 (68%) TGF- β 2 e 14/25 (56%) para TGF- β 3 (Tabela 11 e Gráfico 4).

5 Na análise estatística das citocinas expressas nesse grupo, observamos que algumas
 6 citocinas mostraram ter diferenças estatisticamente significativa durante as comparações
 7 pelo o teste do qui-quadrado. Como a IL-2 comparada: a IL-10 ($p=0,0002$), ao TGF- β 1
 8 ($p=0,0153$), TGF- β 2 ($p=0,0002$) e TGF- β 3 ($p=0,0032$). Ao compararmos a IL-12 com as
 9 outras citocinas também expressas, observamos que esta apresentou diferença estatística
 10 em relação: a IL-10 ($p < 0,0001$), TGF- β 1 ($p=0,0366$), TGF- β 2 ($p=0,0006$) e TGF- β 3

1 (p=0,0087). O TNF- α apresentou diferença estatística ao comparar este com: a IL-10
 2 (p<0,0001), TGF- β 1 (p=0,0055), TGF- β 2 (p<0,0001) e TGF- β 3 (p=0,0010). O IFN- γ
 3 também apresentou diferença estatística ao ser comparado com: a IL-10 (p<0,0001), com o
 4 TGF- β 2 (p=0,0040) e TGF- β 3 (p=0,0449). A IL-10 ao ser comparada com as outras
 5 citocinas expressas por este grupo apresentou diferença estatisticamente significantes em
 6 relação a: IL-4 (p<0,0001), TGF- β 1 (p=0,0007), TGF- β 2 (p=0,0339) e TGF- β 3
 7 (p=0,0037). A IL-4 apresentou diferença estatística ao ser comparada ao TGF- β 2
 8 (p=0,0018) e TGF- β 3 (p=0,0209) (Tabela 11) (Anexos 5).

Tabela 11: Citocinas Expressas pelas pacientes do Grupo Invasivo

Citocinas Positivas										
<i>Amostras</i>	N Total	IL-2 (%)	IL-12 (%)	TNF-α (%)	IFN-γ (%)	IL-10 (%)	IL-4 (%)	TGF-β1 (%)	TGF-β2 (%)	TGF-β3 (%)
INVASIVOS	25/106 (23,58)	4/25 (16)	5/25 (20)	3/25 (12)	7/25 (28)	23/25 (92)	6/25 (24)	12/25 (48)	17/25 (68)	14/25 (56)

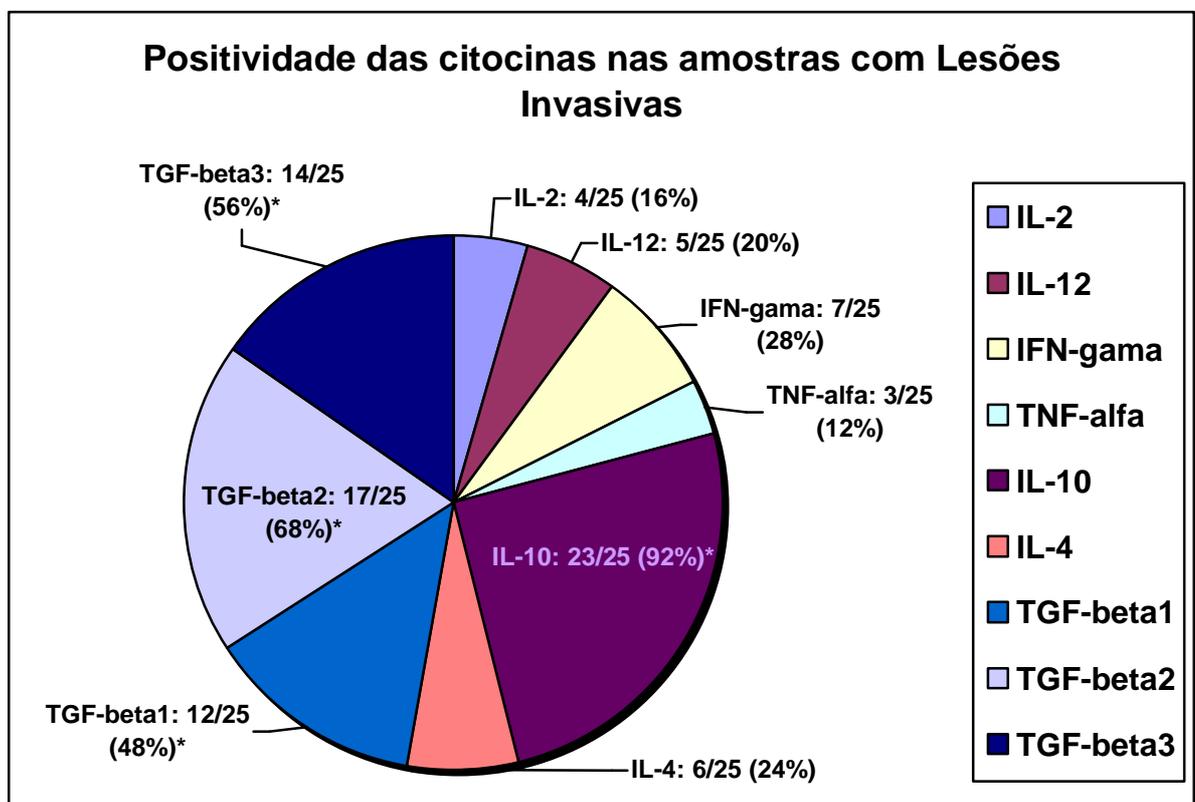


Gráfico 4: Positividade e porcentagem das citocinas nas amostras com Lesões Invasivas (*p<0,05).

5.2.5 - Citocinas expressas pelas Pacientes LSIL / HSIL / Invasivos comparada com as Citocinas expressas pelas Pacientes do grupo Controle

1 As 106 (100%) amostras LSIL/HSIL/Invasivos e as 20 (100%) amostras controles
2 coletadas e submetidas à RT-PCR, apresentaram respectivamente, positividade para as
3 citocinas: IL-2: 21/106 (19,81%) amostras e 6/20 (30%) amostras, sendo que estas não
4 apresentaram diferença estatística ($p=0,3084$); IL-12: 34/106 (32,08%) amostras e 12/20
5 (60%) amostras, apresentando neste caso diferença estatística significativa ($p=0,0174$);
6 IFN- γ : 21/106 (19,81%) amostras e 1/20 (5%) amostras, também não apresentando
7 diferença estatística ($p=0,1095$). O TNF- α : 39/106 (36,79%) amostras e 14/20 (70%)
8 amostras, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,0058$). A IL-10 foi positiva em:
9 81/106 (76,42%) amostras e 17/20 (85%) amostras controles, não apresentaram diferença
10 estatística ($p=0,3970$). A IL-4: 30/106 (28,30%) amostras e 2/20 (10%) amostras, positivas
11 também não tiveram diferença estatística ($p=0,0846$) ao serem comparadas entre os grupos
12 com lesão e grupo controle. Contudo, ao compararmos a expressão dos TGF- β 1, TGF- β 2 e
13 TGF- β 3, entre o grupo com lesões intraepitelial cervical e o grupo controle, observamos
14 que os três tipos de TGF- β , apresentaram diferenças estatisticamente significantes. O TGF-
15 β 1, com 48/106 (45,28%) amostras positivas do grupo com lesões, não obteve positividade
16 (0/20) nas amostras do grupo controle, sendo $p=0,0001$, pelo teste do qui-quadrado. O
17 TGF- β 2 mostrou-se positivo em 61/106 (57,55%) pacientes do grupo com lesões
18 intraepitelial cervical, e em 2/20 (10%) amostras do grupo controle. A diferença estatística
19 foi altamente significativa, com $p<0,0001$. O mesmo valor de p também foi verificado pelo
20 TGF- β 3, sendo a positividade deste para o grupo com lesão de 35/106 (33,02%), e não foi
21 observada positividade desta citocina no grupo controle (0/20) ($p<0,0001$) (Tabela 12 e
22 gráficos 5 e 6).

1 O gráfico 7 mostrou, respectivamente, a tendência linear das porcentagens de todas
2 as citocinas positivas e estudadas nos diferentes graus de lesão, LSIL, HSIL e Invasivo,
3 iniciando pelo grupo controle. Observamos então, que há um aumento de forma acentuada,
4 progressiva e linear das citocinas: IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 à medida que
5 aumenta o grau da lesão.

6 A IL-2, IL-12 e o TNF- α , apresentaram um mesmo perfil de expressão nos
7 diferentes graus de lesão, mostrando uma alta expressão nas amostras do grupo controle,
8 com um declínio progressivo e de tendência linear, sendo que as citocinas, IL-12 e TNF- α ,
9 apresentam um declínio mais acentuado do que a IL-2, à medida que aumenta o grau da
10 lesão, de LSIL a invasivo (Gráfico 7).

11 Já a IL-4 e o IFN- γ apresentaram-se com expressão semelhantes no grupo controle
12 e nos grupos LSIL e HSIL, mostrando-se com expressão oposta no grupo dos pacientes
13 que apresentaram lesões invasivas. No entanto, ao observamos a tendência linear de ambas
14 as citocinas no gráfico 7, podemos notar que estas tendem a aumentar, porém de forma
15 pouco acentuada, na medida em que há o aumento do grau da lesão.

Tabela 12: Número, porcentagem e significância das amostras LSIL/HSIL/Invasivos e amostras controles positivas para as citocinas estudadas e β -actina.

Amostras/ Citocinas	LSIL/HSIL/ INVASIVOS (%)	CONTROLE (%)	TOTAL (%)	$p \leq 0,05$
β - actina	106/106 (100)	20/20 (100)	126/126 (100)	-
IFN- γ	21/106 (19,81)	1/20 (5)	22/126 (17,46)	0,1095
IL-2	21/106 (19,81)	6/20 (30)	27/126 (21,43)	0,3284
IL-12	34/106 (32,08)	12/20 (60)	46/126 (36,50)	0,0174
IL-4	30/106 (28,30)	2/20 (10)	32/126 (25,40)	0,0846
IL-10	81/106 (76,42)	17/20 (85)	98/126 (77,78)	0,3970
TNF-α	39/106 (36,79)	14/20 (70)	53/126 (42,06)	0,0058
TGF - β1	48/106 (45,28)	0/20 (0)	48/126 (38,10)	0,0001
TGF - β2	61/106 (57,55)	2/20 (10)	63/126 (50)	<0,0001
TGF - β3	35/106 (33,02)	0/20 (0)	35/126 (27,78)	<0,0001

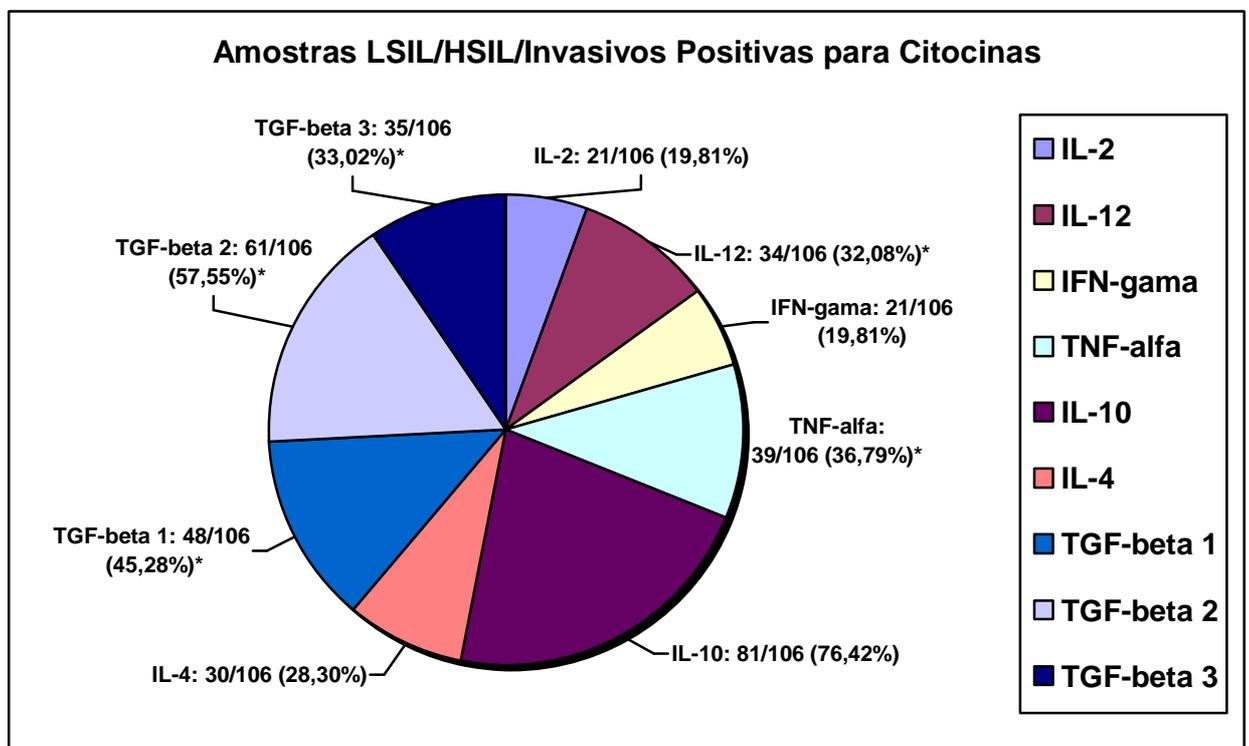


Gráfico 5: Distribuição da positividade das citocinas avaliadas no estudo em relação ao grupo de pacientes com LSIL/HSIL/Invasivos (* $p \leq 0,05$).

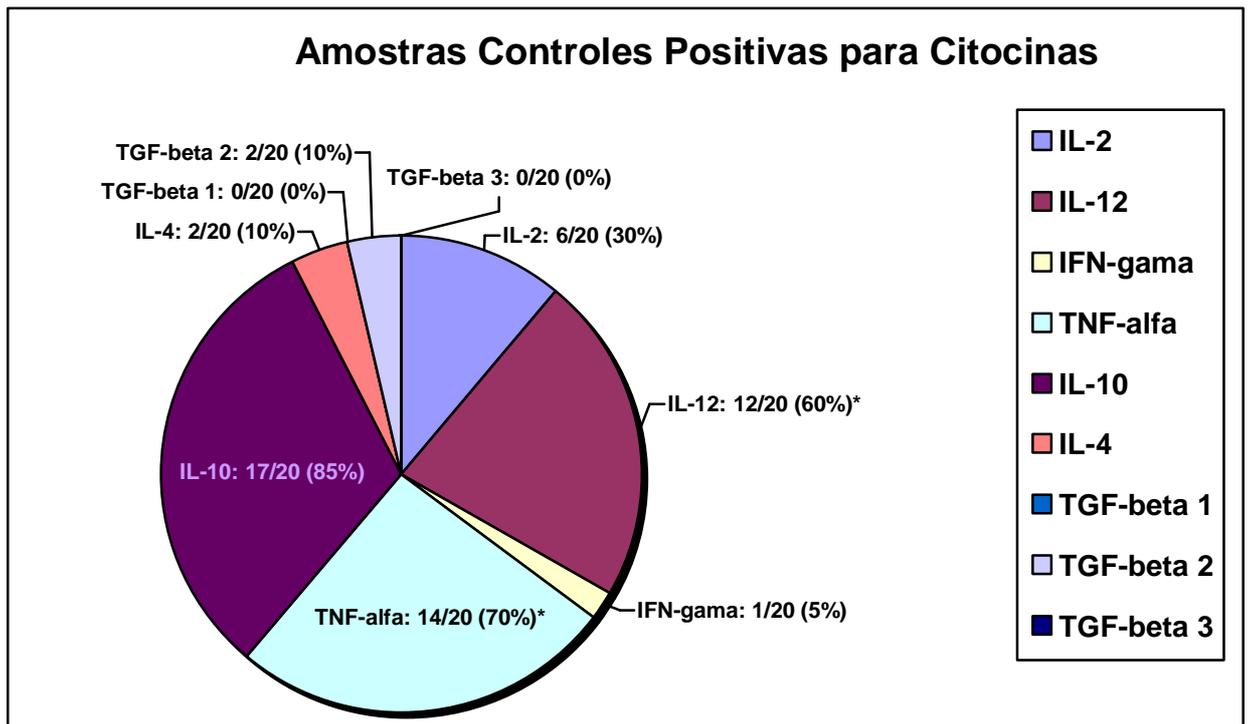


Gráfico 6: Distribuição da positividade das citocinas avaliadas no estudo em relação ao grupo controle ($p \leq 0,005$)

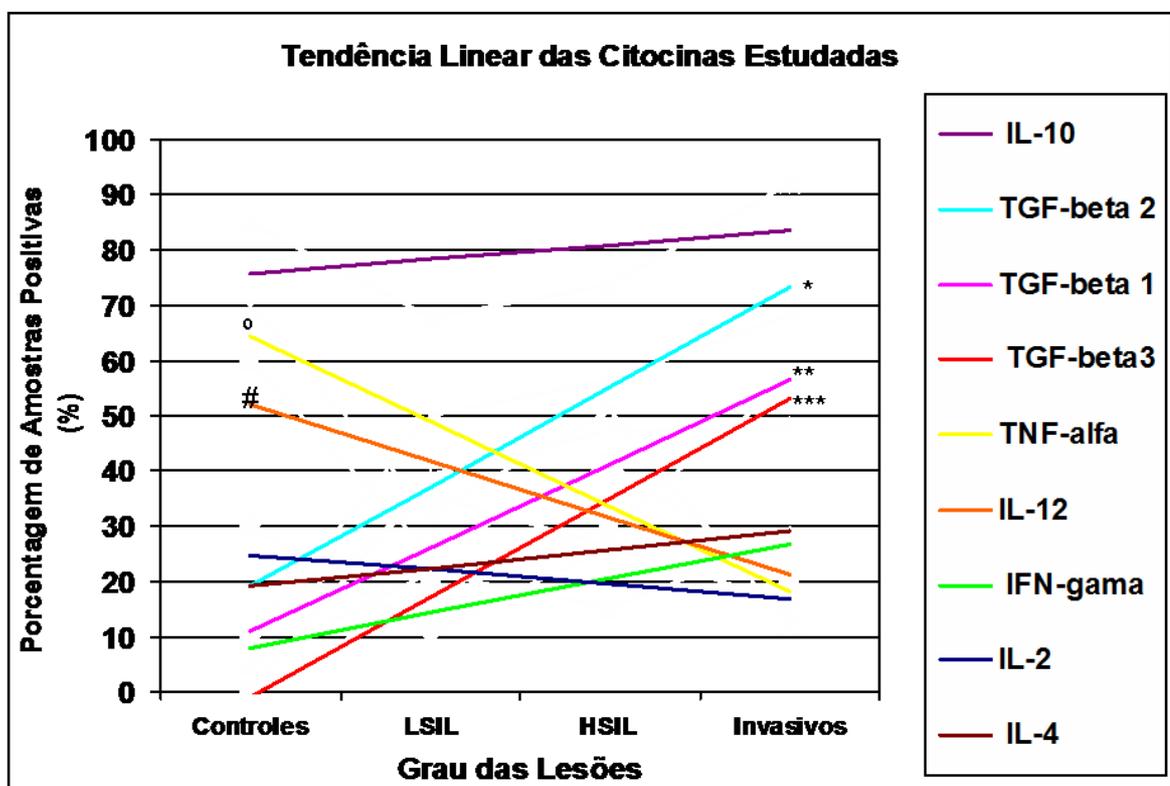


Gráfico 7: Tendência Linear da expressão da porcentagem das citocinas estudadas nos diferentes graus de lesão: LSIL, HSIL, Invasivo e no grupo Controle (* $p < 0,0001$; ** $p = 0,0001$; *** $p < 0,0001$; # $p = 0,174$; ° $p = 0,0058$)

5.3 - Perfil da Resposta Imune

1 Baseado no artigo de revisão Zhu & Paul (2008), consideramos perfil Th1 quando
2 estavam expressas as citocinas: IL-2, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α , sendo considerado o
3 IFN- γ a citocina característica deste perfil. Contudo, somente consideramos o perfil Th1
4 quando alguma destas citocinas estavam presentes, porém na ausência da IL-4 que
5 caracteriza o perfil Th2 e/ou dos TGF- β 1, 2 e/ou 3, que são citocinas que caracterizam o
6 perfil Treg. O perfil Th2 foi caracterizado pela presença das citocinas: IL-4, IL-10 e TGF-
7 β 1, TGF- β 2 e/ou TGF- β 3, sendo a IL-4 a citocina característica deste perfil, portanto,
8 sempre que esta estava presente, independente das outras citocinas expressas consideramos
9 ser perfil Th2. O perfil Treg foi também caracterizado segundo Zhu & Paul (2008) pela
10 presença das citocinas: TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 na presença ou não da IL-10 assim
11 como de outras citocinas, pois, a presença de qualquer um dos tipos de TGF- β já
12 caracteriza este perfil.

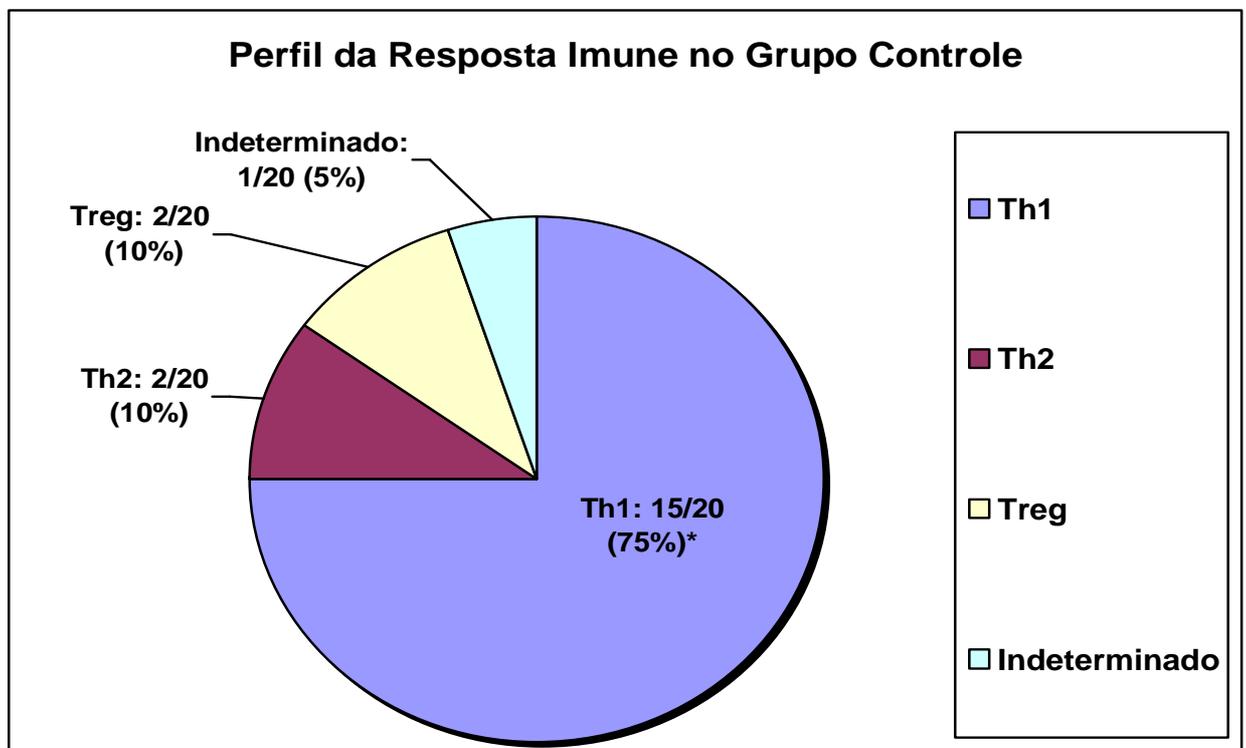
5.3.1 – Perfil da Resposta Imune Local das pacientes do Grupo Controle

13 Na análise do perfil da resposta imune local das pacientes do grupo controle,
14 verificamos que 15/20 (75%) dessas mulheres tinham perfil Th1 e neste a citocina mais
15 freqüente foi a IL-10 (13/15), o TNF- α (11/15) e a IL-12 (10/15). Duas pacientes (2/20)
16 apresentaram perfil Th2 (10%) e outras 2/20 (10%) Treg (Gráfico 10). No perfil Th2 as
17 citocinas mais prevalente foram a IL-4 (2/2) e a IL-10 (2/2), já no perfil Treg a citocina
18 mais freqüente foi o TNF- α (2/2) e o TGF- β 2 (2/2) (Tabela 13 e Gráfico 8).

- 1 Houve diferença estatística entre os perfis: Th1 e Th2, Th1 e Treg e Th1 e
- 2 Indeterminado, onde em todos o p foi $<0,0001$, o que nos leva a afirmar que o perfil de
- 3 resposta imune das amostras controles é do tipo Th1.

Tabela 13: Positividade das citocinas e Perfil da Resposta nas amostras controles

CONTROLE	IL-2 (%)	IL-12 (%)	IFN- γ (%)	TNF- α (%)	IL-10 (%)	IL-4 (%)	TGF- β 1 (%)	TGF- β 2 (%)	TGF- β 3 (%)	TOTAL (%)
Th1	4 /15 (26,67)	10/15 (66,67)	1/15 (6,67)	11/15 (73,33)	13/15 (86,67)	0/15 (0)	0/15 (0)	0/15 (0)	0/15 (0)	15/20 (75)
Th2	1/2 (50)	1/2 (50)	0/2 (0)	1/2 (50)	2/2 (100)	2/2 (100)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	2/20 (10)
Treg	1/2 (50)	1/2 (50)	0/2 (0)	2/2 (100)	1/2 (50)	0/2 (0)	0/2 (0)	2/2 (100)	0/2 (0)	2/20 (10)
Indeterminado	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	1/20 (5)
TOTAL	6/20 (30)	12/20 (60)	1/20 (5)	14/20 (70)	17/20 (85)	2/20 (10)	0/20 (0)	2/20 (10)	0/20 (0)	20/20 (100)

Gráfico 8: Perfil da Resposta Imune no Grupo Controle (* $p<0,0001$).

5.3.2- Perfil da Resposta Imune das Pacientes que apresentaram Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LISL)

1 Ao analisarmos a expressão das citocinas nesse grupo e conseqüentemente o perfil
2 da resposta imune local (Th1, Th2, Treg ou Indeterminado), observamos que das 28
3 pacientes: 6/28 (21,43%) mostram ter um perfil de resposta imune característico de Th1,
4 10/28 (35,71%) com perfil de resposta do tipo Th2 e Treg, e 2/28 (7,14%) pacientes foram
5 classificadas com perfil de resposta imune local indeterminado por não possuir uma
6 citocina característica de cada um dos perfis abordados nesse estudo, apresentando apenas
7 IL-10 (Tabela 14 e gráfico 9).

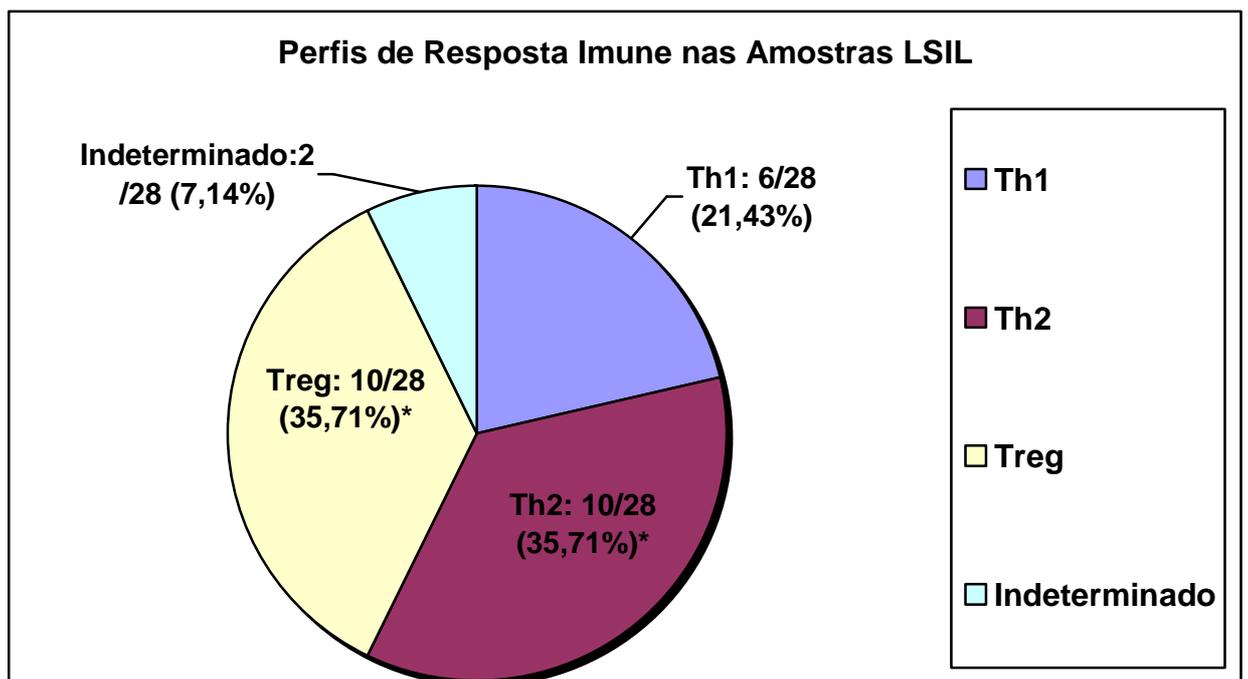
8 No perfil Th1 a citocina mais freqüente foi o TNF- α (4/6) seguido pela IL-12 (2/6),
9 no perfil Th2 a citocina mais freqüente foi primeiramente a IL-4 (10/10) e IL-10 (10/10),
10 seguida pelo TGF- β 1 e TGF- β 2; já no perfil Treg a citocina mais freqüente foi o TGF- β 2
11 (8/10) e a IL-10 (5/10) (Tabela 14).

12 Nesse grupo de lesão houve diferença estatisticamente significante apenas entre o
13 perfil Th2 e Th3 com o perfil Indeterminado, onde $p=0,0092$.

14 Contudo, nesse grau de lesão não podemos sugerir um perfil de resposta imune
15 local, uma vez que não houve diferença estatística em os três perfis analisados (Th1, Th2 e
16 Treg) ($p>0,05$).

Tabela 14: Positividade das Citocinas e Perfil da Resposta Imune nas pacientes do grupo LSIL

LSIL/ CITOCINAS	IL-2 (%)	IL-12 (%)	IFN- γ (%)	TNF- α (%)	IL-10 (%)	IL-4 (%)	TGF- β 1 (%)	TGF- β 2 (%)	TGF- β 3 (%)	TOTAL (%)
Th1	1/6 (16,67)	2/6 (33,33)	1/6 (16,67)	4/6 (66,67)	2/6 (33,33)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	6/28 (21,43)
Th2	2/10 (20)	4/10 (40)	3/10 (30)	0/10 (0)	10/10 (100)	10/10 (100)	7/10 (70)	7/10 (70)	3/10 (30)	10/28 (35,71)
Treg	0/10 (0)	1/10 (10)	2/10 (20)	5/10 (50)	5/10 (50)	0/10 (0)	4/10 (40)	8/10 (80)	2/10 (20)	10/28 (35,71)
Indeterminado	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	2/2 (100)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	2/28 (7,14)
TOTAL	3/28 (10,71)	7/28 (25)	6/28 (21,43)	9/28 (32,14)	19/28 (67,86)	10/28 (35,71)	11/28 (39,29)	15/28 (53,57)	5/28 (17,86)	28/28 (100)

Gráfico 9: Perfil da Resposta Imune no grupo das pacientes LSIL (* $p \leq 0,005$)

5.3.3 - Perfil da Resposta Imune das Pacientes que apresentaram Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL)

- 1 Ao analisarmos o perfil de resposta imune local de cada uma das 53 pacientes desse
- 2 grupo observamos que: 5/53(9,43%) apresentavam perfil Th1, 14/53 (26,42%) Th2, 31/53

1 (58,49%) perfil Treg e 3/53 (5,66%) perfil indeterminado (Tabela 15 e Gráfico 10). No
 2 perfil Th1 a citocina mais freqüente foi o TNF- α (80%) e IL-12 (60%), no perfil Th2 foi
 3 IL-4 (100%), IL-10 (85,71%) e o TGF- β 2 (64,29%), no perfil Treg , IL-10 (67,74%), TGF-
 4 β 2 (67,74%) e β 1 (54,84%) (Tabela 15).

5 Só não houve diferença estatística entre os perfis Th1 e indeterminado ($p=0,4621$),
 6 sendo importante ressaltar a grande diferença estatística entre Th1 e Treg onde $p<0,0001$ e
 7 também entre Th2 e Treg ($p=0,0008$) o que suporta a idéia de que com o aumento do grau
 8 da lesão a tendência é de desenvolver um perfil de resposta imune local do tipo T
 9 regulatório (Treg).

Tabela 15: Positividade das Citocinas e Perfil da Resposta Imune nas pacientes do grupo HSIL

HSIL/ CITOCINAS	IL-2 (%)	IL-12 (%)	IFN- γ (%)	TNF- α (%)	IL-10 (%)	IL-4 (%)	TGF- β 1 (%)	TGF- β 2 (%)	TGF- β 3 (%)	TOTAL (%)
Th1	1/5 (20)	3/5 (60)	1/5 (20)	4/5 (80)	3/5 (60)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	5/53 (9,43)
Th2	2/14 (14,29)	4/14 (28,57)	2/14 (14,29)	1/14 (7,14)	12/14 (85,71)	14/14 (100)	8/14 (57,14)	9/14 (64,29)	3/14 (21,43)	14/53 (26,42)
Treg	11/31 (35,48)	15/31 (48,39)	5/31 (16,13)	22/31 (70,97)	21/31 (67,74)	0/31 (0)	17/31 (54,84)	21/31 (67,74)	13/31 (41,94)	31/53 (58,49)
Indeterminado	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	3/3 (100)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	3/53 (5,66)
TOTAL	14/53 (26,42)	22/53 (41,51)	8/53 (15,09)	27/53 (50,94)	39/53 (73,58)	14/53 (26,42)	25/53 (47,17)	30/53 (56,60)	16/53 (30,19)	53/53 (100)

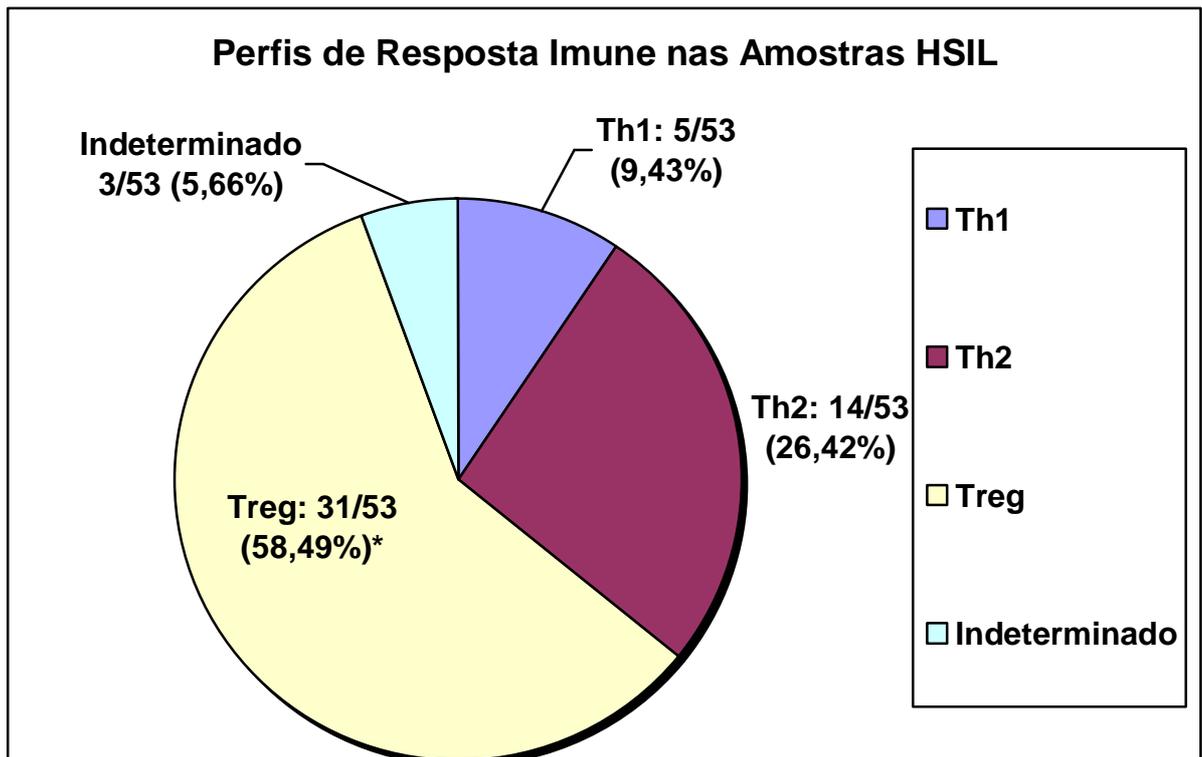


Gráfico 10: Perfil da Resposta Imune dentro das amostras HSIL ($p \leq 0,005$)

5.3.4 - Perfil da Resposta Imune das Pacientes que apresentaram Lesões Invasivas

1 Na análise dos perfis de resposta imune local das 25 mulheres desse grupo,
 2 nenhuma (0/25) apresentou perfil do tipo Th1, 6/25 (24%) apresentaram perfil Th2, 17/25
 3 (68%) Treg e 2/25 (8%) perfil indeterminado (Tabela 16 e Gráfico 11). No perfil Th2 as
 4 citocinas mais prevalente foram a IL-4 e a IL-10, que teve 100% (6/6) de expressão nas
 5 pacientes desses perfis seguidas pelo TGF- β 3 com 83,33% (5/6). No perfil Treg as
 6 citocinas mais frequentes foram a IL-10 (15/17), TGF- β 2 (13/17), TGF- β 1 (10/17) e TGF-
 7 β 3 (9/17) (Tabela 16).

8 Igualmente ao grupo HSIL, este também apresentou uma grande diferença
 9 estatística entre os perfis Th1 e Th2 ($p=0,0090$), Th1 e Treg ($p<0,0001$), Th2 e Treg
 10 ($p=0,0018$) e Treg e Indeterminado ($p<0,0001$). Reforçando mais uma vez a hipótese do

- 1 perfil Treg estar presente com maior evidência e prevalência entre as lesões com grau mais
- 2 elevado.

Tabela 16: Positividade das Citocinas e Perfil da Resposta Imune nas pacientes do grupo com Lesões Invasivas

INVASIVO	IL-2 (%)	IL-12 (%)	IFN- γ (%)	TNF- α (%)	IL-10 (%)	IL-4 (%)	TGF- β 1 (%)	TGF- β 2 (%)	TGF- β 3 (%)	TOTAL (%)
Th1	0/0 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)	0/25 (0)
Th2	2/6 (33,33)	2/6 (33,33)	4/6 (66,67)	0/6 (0)	6/6 (100)	6/6 (100)	2/6 (33,33)	4/6 (66,67)	5/6 (83,33)	6/25 (24)
Treg	2/17 (11,76)	3/17 (17,65)	3/17 (17,65)	3/17 (17,65)	15/17 (88,24)	0/17 (0)	10/17 (58,82)	13/17 (76,47)	9/17 (52,94)	17/25 (68)
Indeterminado	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	2/2 (100)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	2/25 (8)
TOTAL	4/25 (4)	5/25 (20)	7/25 (28)	3/25 (12)	23/25 (92)	6/25 (24)	12/25 (48)	17/25 (68)	14/25 (56)	25/25 (100)

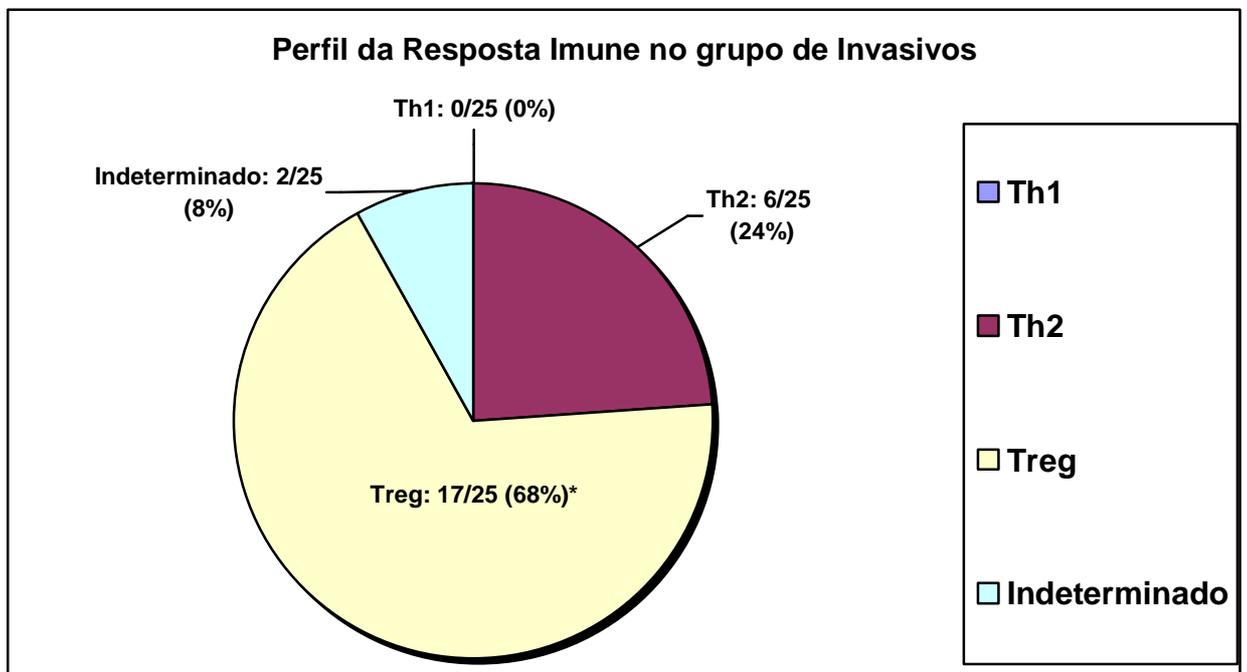


Gráfico 11: Perfil da Resposta Imune nas amostras com carcinoma invasivo (* $p \leq 0,005$)

5.3.5 – Comparação entre o Perfil da Resposta Imune Local das pacientes dos grupos LSIL, HSIL e Lesões Invasivas em relação às do grupo Controle

1 Então, ao analisarmos o perfil de resposta imune local das pacientes com algum
2 grau de lesão em relação às pacientes controles, pode-se observar que somente 11
3 (10,38%) das 106 pacientes com lesões apresentaram perfil do tipo Th1, já as pacientes
4 controles 15/20 (75%) delas apresentaram este perfil, sendo o TNF- α a citocina mais
5 expressa em ambos os grupos (LSIL/HSIL/Invasivos e Controle) (Tabelas 17 e 18; Gráfico
6 12). A análise estatística mostrou uma grande diferença entre os dois grupos onde
7 $p < 0,0001$.

8 O perfil Th2 foi determinado em 30/106 (28,30%) pacientes com lesões e em
9 apenas 2/20 (10%) das pacientes controles, sendo a citocina mais prevalente nesse perfil e
10 em ambos os grupos foi a primeiro a IL-10, depois TGF- β 2 em seguida TGF- β 1 e β 3
11 apenas para as pacientes com lesão e por último a IL-4 (Tabelas 17 e 19; Gráfico 12). Não
12 houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p = 0,0846$) (Tabela 17).
13 Quando comparamos este perfil Th2 entre os grupos LSIL e HSIL também não
14 observamos diferença estatística ($p = 0,3834$), mas entre HSIL e invasivo, observamos uma
15 grande diferença estatística, com $p = 0,0087$ (Tabela 17).

16 Com uma diferença altamente significante ($p = 0,0002$) o perfil Treg foi
17 caracterizado em 58/106 (54,72%) pacientes com algum grau de lesão e em apenas 2/20
18 (10%) pacientes controles (Tabela 17 e 20 e gráfico 12). Nesse perfil a citocina mais
19 prevalente também foi a IL-10, seguida do TGF- β 2, β 1 e β 3, diferenciando do perfil Th2
20 apenas pela ausência neste caso da IL-4 (Tabela 20).

21 Apenas 7/106 (6,60%) pacientes com lesões e 1/20 (5%) paciente controle foram
22 caracterizadas como um perfil indeterminado (Tabelas 17 e 21; Gráfico 12). Não houve
23 diferença estatisticamente significativa ($p = 0,7873$) entre o grupo controle e o grupo das

1 pacientes com lesão. As pacientes que apresentaram perfil indeterminado foram aquelas
2 que apresentaram apenas a expressão da citocina IL-10, que portanto não é uma citocina
3 característica de nem um dos três perfis analisados, podendo esta, apresentar-se associada
4 ao IFN- γ e caracterizar o perfil Th1, associada a IL-4 caracterizando o perfil Th2 ou
5 associada aos TGF- β s caracterizando , neste caso, um perfil de resposta imune
6 Tregulatório (Treg) ou também chamado de Tsupressor.

7 Ao compararmos estatisticamente as pacientes LSIL/HSIL/Invasivos que
8 apresentaram o perfil Th1 com aquelas que apresentaram Th2, pudemos observar uma
9 diferença estatisticamente significativas entre os grupos ($p=0,0010$) . Ao compararmos
10 agora, Th1 com Treg, observamos que esta diferença estatística aumentou
11 significativamente ($p<0,0001$). Em relação Th1 e perfil indeterminado não foi observada
12 diferença estatística entre os grupos ($p=0,3243$). Contudo, os perfis Th2 e Treg,
13 apresentados pelas pacientes com algum grau de lesão, possuem uma diferença
14 estatisticamente significativa quando comparados com o perfil Th1 ($p=0,0010$ e $p<0,0001$,
15 respectivamente), sendo que o perfil indeterminado não apresentou diferença estatística em
16 relação ao Th1 ($p=0,3243$). Podemos, então sugerir que as pacientes com algum grau de
17 lesão, possuem uma tendência maior a desenvolver um perfil de resposta imune local do
18 tipo Treg (Tabela 17; Gráficos 13).

19 O gráfico 13 compara a porcentagem e a tendência linear dos perfis de resposta
20 imune (Th1, Th2, Treg e indeterminado) entre o grupo LSIL/HSIL/Invasivo e o grupo
21 controle. Podemos observar por este gráfico que as pacientes controles apresentaram uma
22 maior porcentagem e tendência para o perfil Th1 (15/20; 75%) sendo que a tendência
23 linear se apresenta com um declínio bastante acentuado para os outros perfis de resposta
24 imune analisados. Ao contrário das pacientes que possuem algum grau de lesão, estas
25 mostraram uma maior porcentagem e tendência ao perfil Treg (58/106; 54,72%), porém a

- 1 tendência linear aumenta de forma constante e progressiva, mas não acentuada, do perfil
- 2 Th1 para o Treg (Gráfico 13).

Tabela 17: Perfil de Respostas Imune Local das Pacientes LSIL/HSIL/Invasivos em relação às pacientes Controles.

Pacientes / Perfil da Resposta Imune Local	Th1 (%)	Th2 (%)	Treg (%)	Indeterminado (%)	TOTAL (%)
LSIL/HSIL/Invasivos	11/106 (10,38)	30/106 (28,30)	58/106 (54,72)	7/106 (6,60)	106/106 (100)
Controles	15/20 (75)	2/20 (10)	2/20 (10)	1/20 (5)	20/20 (100)
p ≤ 0,05	< 0,0001	0,0846	0,0002	0,7873	-
TOTAL	26/126 (20,63)	32/126 (25,40)	60/126 (47,62)	8/126 (6,35)	126/126 (100)

Tabela 18: Comparação da expressão das citocinas das pacientes controles e aquelas com lesão caracterizadas no perfil de resposta imune do tipo Th1.

Citocinas / Perfil de Resposta Imune Th1	IL-2 (%)	IL-12 (%)	IFN-γ (%)	TNF-α (%)	IL-10 (%)	IL-4 (%)	TGF-β1 (%)	TGF-β2 (%)	TGF-β3 (%)	TOTAL (%)
* Th1 Grupo Controle	4 /15 (26,67)	10/15 (66,67)	1/15 (6,67)	11/15 (73,33)	13/15 (86,67)	0/15 (0)	0/15 (0)	0/15 (0)	0/15 (0)	15/20* (75)
* Th1 Grupo LSIL/HSIL/invasivo	2/11 (18,18)	5/11 (45,45)	2/11 (18,18)	8/11 (72,72)	5/11 (45,45)	0/11 (0)	0/11 (0)	0/11 (0)	0/11 (0)	11/106 (10,38)
Total	6/126 (4,76)	15/126 (11,90)	3/126 (2,38)	19/126 (15,08)	18/126 (14,29)	0/126 (0)	0/126 (0)	0/126 (0)	0/126 (0)	26/126 (20,63)

*p<0,0001

Tabela 19: Comparação da expressão das citocinas das pacientes controles e aquelas com lesão caracterizadas no perfil de resposta imune do tipo Th2.

Citocinas / Perfil de Resposta Imune Th2	IL-2 (%)	IL-12 (%)	IFN- γ (%)	TNF- α (%)	IL-10 (%)	IL-4 (%)	TGF- β 1 (%)	TGF- β 2 (%)	TGF- β 3 (%)	TOTAL (%)
* Th2 Grupo	1/2	1/2	0/2	1/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/20
Controle	(50)	(50)	(0)	(50)	(100)	(100)	(0)	(0)	(0)	(10)
* Th2 Grupo LSIL/HSIL/invasivo	6/30 (20)	10/30 (33,33)	9/30 (30)	1/30 (3,33)	28/30 (93,33)	30/30 (100)	17/30 (56,67)	20/30 (66,67)	11/30 (36,67)	30/106 (28,30)
Total	7/126 (5,56)	11/126 (8,73)	9/126 (7,14)	2/126 (1,59)	30/126 (23,81)	32/126 (25,40)	17/126 (13,49)	20/126 (15,87)	11/126 (8,73)	32/126 (25,40)

*p=0,0846

Tabela 20: Comparação da expressão das citocinas das pacientes controles e aquelas com lesão caracterizadas no perfil de resposta imune do tipo Treg.

Citocinas / Perfil de Resposta Imune Treg	IL-2 (%)	IL-12 (%)	IFN- γ (%)	TNF- α (%)	IL-10 (%)	IL-4 (%)	TGF- β 1 (%)	TGF- β 2 (%)	TGF- β 3 (%)	TOTAL (%)
* Treg Grupo	1/2	1/2	0/2	2/2	1/2	0/2	0/2	2/2	0/2	2/20
Controle	(50)	(50)	(0)	(100)	(50)	(0)	(0)	(100)	(0)	(10)
* Treg Grupo LSIL/HSIL/invasivo	13/58 (22,41)	19/58 (32,75)	10/58 (17,24)	30/58 (51,72)	41/58 (70,70)	0/58 (0)	31/58 (53,45)	42/58 (72,24)	24/58 (41,38)	58/106*
Total	14/126 (1,11)	20/126 (15,87)	10/126 (7,94)	32/126 (25,39)	42/126 (33,33)	0/126 (0)	31/126 (24,60)	44/126 (34,92)	24/126 (19,05)	60/126 (47,62)

*p=0,0002

Tabela 21: Comparação da expressão das citocinas das pacientes controles e aquelas com lesão caracterizadas no perfil de resposta imune do tipo indeterminado.

Citocinas / Perfil de Resposta Imune Indeterminado	IL-2 (%)	IL-12 (%)	IFN- γ (%)	TNF- α (%)	IL-10 (%)	IL-4 (%)	TGF- β 1 (%)	TGF- β 2 (%)	TGF- β 3 (%)	TOTAL (%)
* Grupo	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/20
Controle	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)	(0)	(5)
* Grupo LSIL/HSIL/ Invasivo	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	7/7 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	7/106 (6,60)
Total	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	8/126 (6,35)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	8/126 (6,35)

*p=0,7873

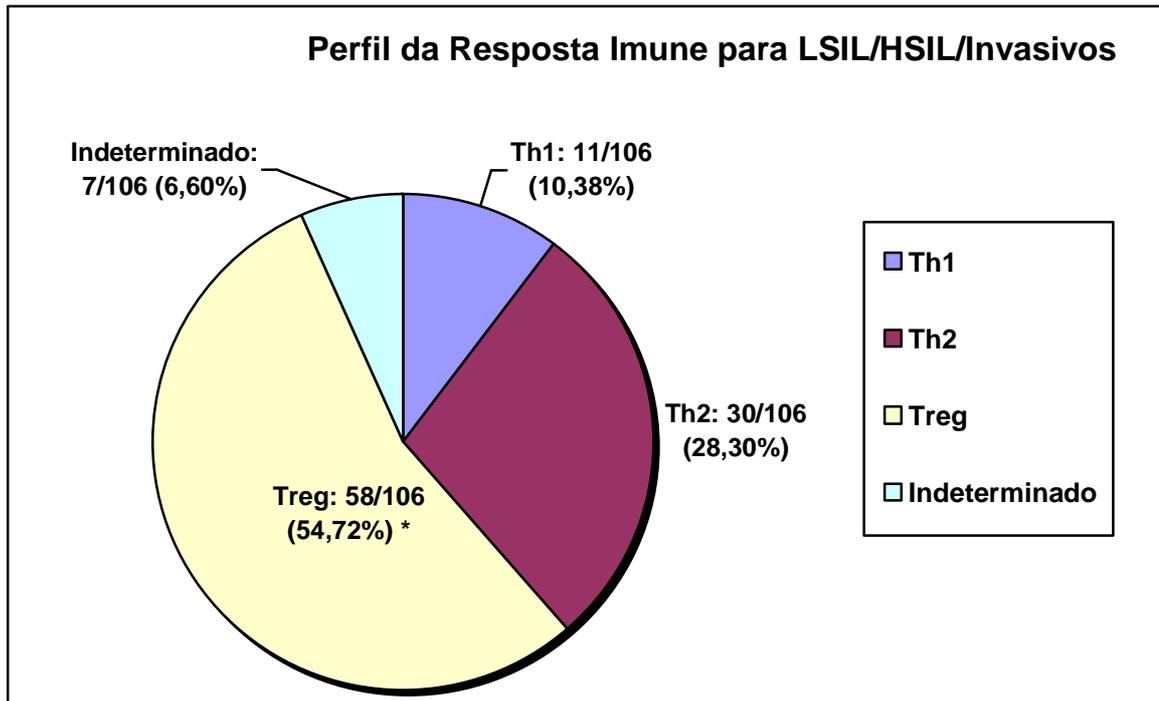


Gráfico 12: Caracterização do Perfil da Resposta Imune das Amostras LSIL/HSIL/Invasivos (* $p \leq 0,005$).

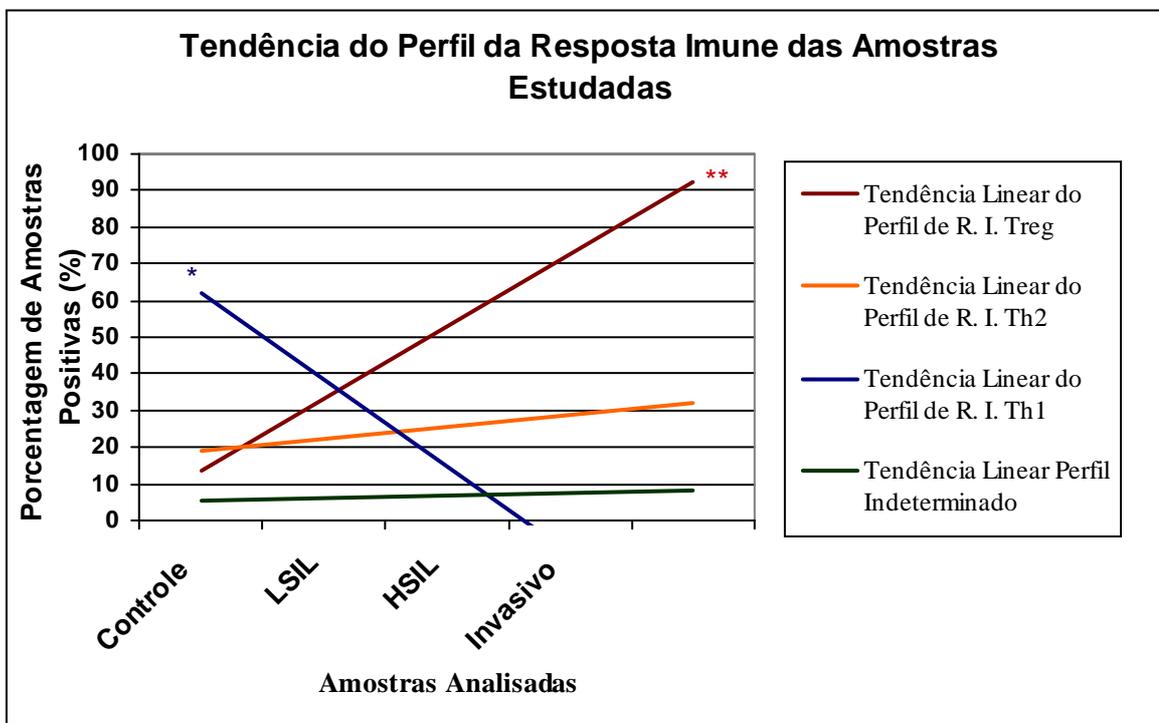


Gráfico 13: Tendência linear do Perfil da Resposta Imune nos diferentes graus de lesão: LSIL, HSIL, Invasivos e no grupo Controle (* $p < 0,0001$; ** $p = 0,0002$).

6 – Discussão

1 A resposta imunológica sistêmica e local de pacientes com neoplasia intraepitelial
2 cervical e câncer têm sido alvos de estudos há algum tempo, porém ainda é motivo de
3 controvérsias. Trabalhos específicos em resposta imune local do câncer de colo uterino são
4 escassos, desta forma, o presente trabalho investigou a expressão local de algumas
5 citocinas e conseqüentemente a eventual existência de associação entre a progressão da
6 lesão cervical, com os perfis de resposta imune local (Th1, Th2 ou Tregulatório).

7 A incidência do câncer do colo do útero torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29
8 anos e o risco aumenta rapidamente, até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 45 a
9 49 anos (INCA, 2009). Em acordo, neste estudo, a idade média total do grupo das
10 pacientes com lesão intraepitelial cervical foi de 35,2 anos, sendo a média dos grupos das
11 pacientes com diagnóstico de LSIL foi de 32,43 anos, grupo HSIL 33,57 anos e pacientes
12 com lesão invasiva 41,92 anos, sendo que, em todos os três grupos estudados a faixa etária
13 mais prevalente foi entre 27 a 37 anos. De acordo com nossos dados temos os trabalhos de
14 Herbst *et al.* (1992) e Palo *et al.* (2002), que também observaram um aumento da
15 freqüência de lesões com maior grau de comprometimento celular. Há evidências de que o
16 câncer do colo uterino é mais agressivo em mulheres jovens, com idade inferior a 40 anos
17 (CHAVES *et al.*, 1984), trabalhos estes que também corroboram com nossos dados. Assim
18 como o de CAVALCANTI *et al.* (2000), que realizaram um estudo epidemiológico no
19 Brasil, e encontraram média de 36,7 anos para as mulheres com diagnóstico de lesão
20 intraepitelial de alto grau (HSIL) e de 47,3 anos para as pacientes com carcinoma invasivo.
21 MOUGEN e colaboradores (2001), observaram que os diagnósticos de HSIL ocorrem
22 preferencialmente em mulheres com idade entre 35 e 40 anos. Essas médias de idades
23 descritas na literatura são semelhantes às encontradas em nosso estudo.

1 Apesar da resposta imune ao câncer cervical, às NICs e infecção pelo HPV não
2 estar completamente elucidada, estudos provenientes com outras infecções por patógenos
3 intracelulares demonstram a importância das células T e das citocinas, na indução e
4 manutenção de uma resposta imune efetiva contra tais patógenos. No entanto, as citocinas
5 têm um papel relevante na resposta imunológica adaptativa, determinando de forma
6 específica, efetiva e especializada a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺. Assim, as
7 citocinas podem ser caracterizadas de acordo como os efeitos que causam: estimulantes
8 (pró-inflamatório) ou inibidores/supressores (antiinflamatório) (HAUSER, 1995).

9 Segundo Huang e colaboradores (1995), a mudança na expressão de citocinas pró-
10 inflamatórias para antinflamatórias pode facilitar a progressão tumoral por subversão dos
11 mecanismos de imunovigilância celular.

12 Estudos apontam aumento da concentração de TNF- α em pacientes com NIC
13 (PARDO-GOVEA *et al.*, 2005; AZAR *et al.*, 2004). Entretanto, em outros trabalhos (BAIS
14 *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2004; EL-SHERIF *et al.*, 2001) observou-se decréscimo sistêmico
15 de interleucinas Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-2) relacionados ao aumento do grau da NIC.
16 SCOTT *et al.* (1999) sugere que a persistência da infecção viral do HPV se daria por falha
17 em expressar citocinas Th1.

18 Observamos, em nosso estudo, que a proporção de citocinas proinflamatórias como
19 a IL-2, IL-12 TNF- α e IFN- γ , apresentaram-se em menor frequência nas pacientes dos
20 grupos LSIL, HSIL e invasivo quando comparado ao grupo controle. Isso faz reforçar a
21 idéia de que ocorre decréscimo de citocinas Th1 nas lesões de alto grau, tendo em vista que
22 essas citocinas estão envolvidos na erradicação de patógenos intracelulares e são potentes
23 ativadores da imunidade mediada por células.

24 A presença de um infiltrado imune inflamatório intratumoral parece ser um sinal
25 positivo de imunovigilância, e portanto favorável ao hospedeiro (HANAHAN *et al.*, 2003).

1 Entretanto, dependendo dos tipos celulares envolvidos nas resposta anti-tumorais, sejam
2 elas pertencentes à imunidade inata ou adaptativa, podem ou não favorecerem a progressão
3 tumoral (HANAHAN *et al.*, 2003; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2007).

4 O TNF- α é um dos principais mediadores da inflamação na pele e mucosas e
5 portanto, seria a primeira barreira encontrada pelos vírus epiteliotrópicos como o HPV
6 (WILSON *et al.*, 1997; KROEGER *et al.*, 1997).

7 Diversas evidências sugerem que o TNF- α está direta ou indiretamente envolvido
8 em mecanismos efetores mediados pelas células imunes para o combate de infecções pelo
9 HPV, pois segundo Hagari *et al.* (1995), altos níveis de expressão dessa citocinas está
10 correlacionado aos mecanismos de eliminação viral, como a apoptose e a regressão
11 espontânea de lesões cutâneas associadas aos HPVs.

12 Entretanto, resultados controversos também foram descritos em relação ao TNF- α .
13 Kirckpatrick *et al.* (2004) encontraram uma menor expressão dessa citocina no grupo de
14 pacientes com NIC do que em controles. DUARTE *et al.* (2005) em um estudo com 195
15 pacientes com câncer cervical e 244 controles saudáveis relataram que uma expressão
16 aumentada do TNF- α elevava em duas vezes o risco de desenvolver a neoplasia invasiva.

17 A expressão de TNF- α também se mostrou elevada nos tecidos de
18 anatomopatológicos de pacientes com NICs, mas quando estas pacientes foram analisadas
19 em relação às pacientes do grupo controle, Pardo-Govea *et al.* (2005) não se encontraram
20 diferenças estatísticas, então esta citocina não modifica a sua expressão de acordo com a
21 gravidade da doença. Semelhantemente, observamos no presente estudo, que houve uma
22 maior porcentagem de pacientes com HSIL expressando o TNF- α , comparado aos grupos
23 LSIL e invasivo, ou seja, há um aumento gradual da expressão dessa citocina, à medida
24 que observamos uma evolução da lesão de LSIL para HSIL, mas esta expressão diminui de
25 forma acentuada e estatisticamente significante ($p=0,0010$) de HSIL para lesão invasiva

1 (gráfico 8). Mas, quando comparamos conjuntamente os grupos com lesões pré-
2 neoplásicas e neoplásicas com o grupo controle observamos uma redução significativa na
3 expressão dessa citocina, o que nos permite inferir que o TNF- α pode não estar
4 influenciando na progressão da lesão, pois, caso contrário, deveria apresentar crescimentos
5 constantes e significativos à medida que aumenta o grau da lesão.

6 Também se observam resultados contraditórios em relação à secreção e expressão
7 de IFN- γ . A expressão local de citocinas Th1 como IFN- γ e IL-2 encontravam-se elevadas
8 em pacientes com lesão cervical, quando comparadas aos controles, e Pardo-Govea *et al.*
9 (2005), observaram que existem uma relação direta a progressão da lesão e o aumento do
10 IFN- γ . A super-expressão dessa citocina pode ser devido a uma resposta das células
11 cervicais à gravidade da lesão, o que sugere que o perfil Th1 seria o tipo de resposta das
12 células cervicais anormais, em reação à presença do HPV, estes dados corroboram com os
13 reportados por Scott, Stites & Moscicki (1999), mas não com os resultados encontrados
14 nesse estudo.

15 Porém, Pao *et al.* (1995) evidência uma redução na expressão do IFN- γ pode
16 influenciar nos mecanismos inflamatórios e imunológicos no câncer cervical.

17 Estudos *in vivo* sugerem que TNF- α e IFN- γ são dependentes um do outro, e que os
18 efeitos contrários ou sinérgico entre as duas citocinas, dependem do estágio de
19 diferenciação e maturação celular, por exemplo, TNF- α pode tanto aumentar quanto inibir
20 a expressão de moléculas HLA de classe II induzida por IFN- γ (WATANABE e JACOB;
21 1991).

22 Os dados supracitados de Watanabe & Jacob (1991); Scott, Stites & Moscicki
23 (1999) e Pardo-Govea *et al.* (2005), em relação ao IFN- γ , vem reforçar nossos achados,
24 onde observamos um aumento linear e gradativo, porém, não significativo dessa citocina,
25 mas de forma proporcional ao grau da lesão (Gráfico 9).

1 Vários estudos sugerem que níveis baixos de citocinas Th1 e intensificados de Th2
2 estão associados com o desenvolvimento do carcinoma cervical, Contrariamente ao
3 demonstrado no trabalho de Tsukui e colaboradores (1996), onde observaram que a
4 produção de IL-2 em lesões pré-invasivas, diminui com aumento da gravidade da doença.

5 A IL-2 e a IL-12, classicamente consideradas do perfil Th1, pois são potentes
6 estimulador da produção de INF- γ e também da diferenciação e ampliação desse perfil de
7 resposta imune. Guzmán-Rojas e colaboradores (1998), também não detectaram a
8 expressão de citocinas que aumentam a atividade antitumoral, como IL-2 e IL-12, em
9 biópsias de pacientes com câncer cervical, em estadio avançado, mas identificaram
10 citocinas imunossupressoras, tais como, IL10, IL-4 e TGF- β .

11 Nossos dados estão de acordo com a literatura, pois encontramos baixa frequência
12 na expressão da IL-2 e IL-12 nas pacientes com lesões cervicais de vários graus, sendo que
13 para a IL-12 esta diferença foi significativa comparada ao grupo controle. Já era esperado
14 tais resultados, pois se encontra bem elucidado o papel biológico da IL-12, sendo uma
15 citocina multifuncional ela promove uma ponte de ligação entre a resposta imune inata e
16 adaptativa, agindo como molécula chave reguladora da resposta imune mediada por
17 células, através da indução da diferenciação de células TCD4⁺ em células Th1, além de
18 promover reativação e sobrevivência das células TCD4⁺ de memória. IL-12 induz a
19 produção de IFN- γ pelos macrófagos, proliferação e atividade citolítica de NK e células
20 TCD8⁺, além de ter atividade antiangiogênica mediado pelo IFN- γ , prevenindo portanto,
21 infecções virais, progressão tumoral e inibição da atividade metastática (DEL VELCHIO *et*
22 *al.*, 2007). Outra função relevante da IL-12, principalmente devido à disfunção tumoral, é
23 sua capacidade de repolarização do perfil Th2 para o Th1, por possuir atividade
24 imunomoduladora e antiangiogênica, pode ser utilizada para tratamentos imunoterápicos
25 contra vários tipos de cânceres (WESA *et al.*, 2007).

1 Evidências sugerem uma regulação cruzada, sinérgica ou antagônica, entre
2 diferentes perfis de citocinas nas respostas imunes. Se por um lado, citocinas pro
3 inflamatórias, como o IFN- γ , induzem a resposta imune pró-inflamatória que se mostra
4 efetiva contra infecções virais e neoplasias, por outro lado, citocinas imunoinibitórias,
5 como IL-10, induzem a resposta imune humoral, eficaz contra antígenos extracelulares,
6 entretanto, permissiva ao desenvolvimento de tumores.

7 Kirpatrick *et al.* (2004) mostraram que mulheres com resposta pró-inflamatória
8 reduzida são mais susceptíveis à persistência viral e, conseqüentemente ao
9 desenvolvimento de neoplasia cervical. Petry e colaboradores (1994) acreditam que o papel
10 da imunidade local para controlar a infecção pelo HPV e o subseqüente desenvolvimento
11 das lesões cervicais é mostrado, indiretamente, pela freqüência aumentada de lesões
12 associadas às infecções pelo HPV em pacientes que apresentam uma redução do perfil
13 Th1. O mesmo podemos dizer em nosso estudo, onde verificamos uma freqüência de 75%
14 do perfil Th1 nas pacientes controles e de apenas 10,38% das pacientes com algum grau de
15 lesão cervical.

16 Em relação às citocinas imunossupressoras, foi possível observarmos, no presente
17 trabalho que, à medida que aumenta o grau da lesão, há um aumento significativo na
18 expressão dessas citocinas imunoinibitórias, como IL-10, IL-4 e TGF- β 1, 2 e 3, sendo que
19 a presença da IL-4 caracterizou perfil Th2 e a expressão de algum tipo de TGF- β
20 associados ou não a outras citocinas, que não a IL-4 caracterizou o perfil Treg. Neste
21 sentido, Clerici *et al.* (1997), De Grujil *et al.* (1999) e Bor-Ching *et al.* (2001), acreditam
22 que a expressão das citocinas IL-4, IL-10 e do TGF- β 1 correlacionam com a gravidade da
23 doença associada com a infecção pelo papilomavírus humano. Portanto, a expressão de um
24 perfil de citocinas antiinflamatórias no microambiente tumoral cervical, favorece um estado
25 de imunossupressão local, que está associada à desregulação de várias moléculas da

1 resposta imune (SHEU *et al.*, 2001). Em apoio a essa hipótese, foram relatadas diversas
2 alterações da resposta imune em pacientes com lesões cervicais pré-malignas e malignas.
3 Como exemplo, tem sido observada uma baixa expressão de moléculas do MHC Classe I
4 associada à baixa expressão de TAP1, (RITZ *et al.*, 2001); diminuição na expressão de
5 moléculas co-estimuladoras como B7 sobre as células tumorais (ELLIS *et al.*, 1995); baixa
6 expressão de CD25 (SHEU *et al.*, 1997) e da cadeia ζ do complexo TCR/CD3 em
7 linfócitos T infiltrando o tecido tumoral e em células NKT (KONO *et al.*, 1996; DE
8 GRUJIL *et al.*, 1999).

9 As células epiteliais infectadas pelos tipos de HPV de alto risco, parecem se
10 tornarem alteradas no câncer cervical pelas ações de citocinas como: IL-10, IL-2, IL-6 e
11 IL-8, TNF- α , TGF- β , sendo que, Kim e colaboradores (1995), acreditam que há um
12 comprometimento dos mecanismos imune efetores em relação às respostas humoral e
13 celular, demonstrando ser um dos mecanismos de evasão viral ou tumoral da resposta
14 imune mediada por células T.

15 Vários trabalhos apontam para o fato que, em estágios pré-neoplásicas do
16 carcinoma cervical, tende a ocorrer uma polarização do padrão Th1, com expressão
17 aumentada de citocinas como IFN- γ , enquanto que, nos estágios avançados da doença, a
18 polarização se desvia para o padrão Th2, caracterizado pela expressão de IL-4 e/ou IL-5,
19 com acentuada capacidade metastática (AGARWAL *et al.*, 2003). Nossos resultados em
20 relação à caracterização do perfil da resposta imune local, baseado na produção de
21 citocinas também locais, estão de acordo com os de Agarwal e colaboradores (2003), pois
22 também observamos um predomínio do perfil Th1 apenas nas pacientes controles (75%),
23 curiosamente, nas pacientes do grupo LSIL, observamos iguais proporções de pacientes
24 (35,71%) apresentando perfil Th2 e Tregulatório (Tabela 14). Mas, à medida que aumenta
25 o grau da lesão, ou seja, LSIL para HSIL e este para lesão invasiva, verificamos um

1 predomínio significativo do perfil Treg, enquanto que o Th2 permanece aproximadamente
2 constante durante a progressão da lesão (Gráfico 13).

3 Reforçando os achados, lesões cervicais persistentes não exibem inflamação e
4 podem desenvolver tolerância. Porém, o desenvolvimento de NIC tem sido associada com
5 um padrão Th2 de secreção de citocinas e que a proporção IL-12/IL-10 está reduzida
6 (CLERICI *et al.*, 1997; EL-SHERIF *et al.*, 2001) e as citocinas imunossupressivas tais
7 como TGF- β e IL-10 estão aumentadas (TJIONG *et al.*, 2001; ZITVOGEL, TESNIERE &
8 KROEMER, 2006). Lembrando que o perfil Treg foi caracterizado no nosso estudo, pela
9 presença do TGF- β (1, 2 ou 3) associado ou não a outras citocinas que não a IL-4, que sua
10 expressão, associada ou não a outras citocinas, caracterizou o perfil Th2, e que segundo
11 dados na literatura mundial os TGF- β s induzem a expressão da proteína FOXP3 pelas
12 células T CD4⁺ regulatórias (Treg), segundo Wan & Flavel (2007), diminuindo o grau de
13 expressão de FOXP3, pode haver uma conversão de células Treg para Th2, o que implica
14 uma estreita relação entre Treg e Th2, e que portanto, reforça nossos achados em relação à
15 polarização Th2 para Treg, pois à medida que observamos a progressão da lesão há um
16 aumento acentuado e significativo dos TGF- β 1, β 2 e β 3 (Gráfico 13).

17 Porém, a imunidade de mucosas contra a infecção pelo HPV e contra as neoplasias
18 pré- e invasivas do colo do útero é pouco compreendida (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Pois
19 quais seriam a(s) associação(s) das citocinas para favorecer o progresso tumoral, uma vez
20 que a IL-10 também foi expressa em pacientes do nosso grupo controle?

21 O papel da IL-10 na biologia tumoral permanece não elucidado. Os resultados de
22 estudos de associação, correlacionando o risco/prognóstico do câncer, são controversos.
23 Enquanto alguns estudos apresentam a IL-10 como promotora do câncer, como resultado
24 de seus efeitos antiinflamatórios, outros a apontam como inibitória ao desenvolvimento
25 tumoral, como resultado, por exemplo, de inibição de fatores angiogênicos. Deste modo, a

1 IL-10 parece ter um efeito pleiotrópico complexo na imunidade antitumoral, sendo capaz
2 de aumentar ou diminuir a imunogenicidade tumoral, o que justifica os resultados
3 contraditórios descritos nos estudos a seguir, e suportam nossos achados, onde verificamos
4 uma expressão aproximadamente constante da IL-10 entre os 4 grupos do presente estudo,
5 mais estudos são necessários para elucidar o real papel da IL-10 tanto na mucosa cervical
6 normal, quanto naquelas com algum grau de lesão, porém sabe-se que a IL-10 é requerida
7 para a manutenção da tolerância de células T em mucosas (MILLS & MAC GUIRK,
8 2004).

9 Segundo Bais *et al.* (2005), a resposta imune nas NICs tem um perfil de resposta
10 imune predominantemente imunoinibitório/supressor, com secreção elevada de algumas
11 citocinas como a IL-10, pois acreditam que esta citocina altera os mecanismos da
12 imunovigilância, seja favorável às transformações neoplásicas e permitindo à progressão
13 das lesões cervicais para o câncer cervical. Azar *et al.* (2004) encontraram níveis mais altos
14 de IL-10 em pacientes com LSIL e hipotetizaram que a super-expressão desta citocina
15 poderiam contribuir para o bloqueio ou inibição da resposta imune em estádios iniciais das
16 lesões cervicais. Os altos níveis de IL-10 poderiam: a) inibir citocinas como a IL-2, TNF,
17 IL-4, IL-6, IL-12, envolvidas na imunorregulação Th1 / Th2; b) diminuir a expressão de
18 moléculas MHC de classe I e II; ou c) induzira transcrição de promotores precoces do
19 HPV.

20 A capacidade que cada ser humano tem, de expressar e secretar diferentes níveis e
21 perfis de citocinas, parece ser de extrema importância na resposta imune contra a infecção
22 pelo HPV e na oncogênese das lesões cervicais (HUTCHINSON *et al.*, 1999).

23 Pacientes com câncer cervical parece ser geneticamente predispostas a produzir
24 altos níveis de IL-10. Em contra partida, num estudo de polimorfismos de genes para
25 citocinas, realizado por Stanczuk *et al.* (2001), demonstraram que a prevalência de alelos

1 associados à baixa produção da IL-10, foi menor nas pacientes com neoplasia invasiva de
2 colo uterino quando comparadas com o grupo controle.

3 Tem sido sugerido que mulheres com lesão cervical induzidas pelo HPV-16 e
4 portadoras de alelos para baixa produção da IL-10, apresentam níveis intralesionais da
5 citocina maiores do que as pacientes saudáveis, sugerindo que as infecções pelos HPVs e a
6 altere a resposta imune local, contribuindo para a persistência da infecção e
7 desenvolvimento das NICs e das neoplasias invasivas (FERNANDES *et al.*, 2004).

8 Porém há evidências de que a IL-10 não é sempre imunossupressora e promotora de
9 evasão tumoral (MOCELLIN *et al.*, 2005). Ao contrário, em alguns estudos evidencia-se a
10 participação da IL-10 no “clearance” viral e há outros estudos, como por exemplo, no de
11 Zoodsma *et al.* (2005), que não observaram diferença na frequência da expressão da IL-10,
12 quando investigaram 1006 mulheres com NIC II, NIC III e carcinoma de colo uterino,
13 comparando-as com controles saudáveis. Dados esses, que suportam nossos achados, onde
14 a IL-10 manteve em grande frequência tanto em pacientes com lesão cervical como em
15 pacientes controles. Assim como os estudos de Moscicki *et al.* (1998) e Pinto *et al.* (2005),
16 também indicam um possível papel da IL-10 na prevenção do câncer cervical, através da
17 eliminação do HPV ou possivelmente do índice de “clearance”, que varia entre 6 e 24
18 meses.

19 A supressão no microambiente tumoral é mediada por um único subconjunto de
20 células Treg, a qual produz IL-10 e TGF- β 1 e não requer o contato célula-a-célula entre
21 Treg e outras células para haver a inibição (STRAUSS, *et al.*, 2007).

22 A presença de imunossupressão, no meio ambiente tumoral, facilita a evasão dessas
23 células da resposta imune do hospedeiro. O que caracterizaria essa imunossupressão,
24 segundo Piersma *et al.* (2008), é a presença de LTreg CD8⁺ infiltrando no tumor, LTreg
25 CD4⁺ peritumoral, além da produção de citocinas consideradas imunossupressoras como,

1 IL-10, TGF- β e IL-7, produzidas pelas próprias células tumorais e pelos linfócitos Treg
2 presentes.

3 TGF- β s também chamadas de inibinas ou activinas, modula a proliferação celular e
4 a expressão de genes em diversas células. Inibe a proliferação de células epiteliais, podendo
5 inibir ou estimular a diferenciação celular, além de serem considerados fatores angiogênicos.
6 Alterações na expressão e resposta, geralmente ocorrem em lesões malignas.

7 Coffey *et al.*(1988) observaram que o TGF- β 1 inibe a proliferação de células
8 epiteliais genitais. TGF- β induz expressão de FOXP3 em células T CD4⁺ *in vitro*, essa
9 expressão aumenta quando essa citocina é incubada juntamente com a IL-2. A habilidade do
10 TGF- β em induzir a expressão de FOXP3 e levar a célula a ter imediatamente um fenótipo
11 supressivo, sugere o potencial terapêutico de intervenção tumoral (DADVISON *et al.*,2007).
12 Contudo, no nosso estudo, podemos justificar ou hipotetizar, que a presença da IL-2 em
13 pacientes com o perfil de resposta imune do tipo Th2 ou Treg, apresentando ou não
14 (controle) lesão cervical, torna-se necessária, porém não suficiente para manter o perfil
15 Treg, pois a IL-2 é necessária para a sobrevivência e função de células Treg, a sobrevivência pode
16 ser induzida por proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2. Além disso, a IL-2 tem função de
17 promover a progressão do ciclo celular através da síntese de ciclinas, além de evitar um
18 bloqueio na progressão do ciclo celular através da degradação de p27 (ABBAS,
19 LICHTMAN & PILLAI, 2008). Já os TGF- β s tem função de regular a síntese de ciclinas e
20 de ciclinas dependentes de cinase (CDK), podendo inibir a atividade de algumas ciclinas,
21 como a da ciclina E – CDK2 (DIAZ-CHAVEZ *et al.*, 2008). Em células normais, a
22 proliferação é regulada por um conjunto de eventos que se desenvolvem de modo
23 sincronizado que vão convergir na regulação do ciclo celular, ou seja, regulação do
24 crescimento mitótico e anti-proliferativo, dessas (REBECCA & BLOBE, 2005), além de

1 preveni a progressão do ciclo celular pela indução da expressão de proteínas inibitórias de
2 CDKs como, p15, p21 e p27, a qual bloqueia ciclinas e CDKs fosforilando a proteína
3 Retinoblastoma (pRb) que irá culminar na supressão da expressão do gene *c-myc*
4 (PIETENPOL *et al.*, 1990). Cerca de >85% de todos os cânceres humanos, desenvolvem
5 resistência aos efeitos epiteliais dos TGF- β s, em alguns cânceres os mecanismos para a
6 resistência estão bem definidos, podendo ser defeitos nas proteínas Smad
7 (predominantemente a Smad4) ou nos receptores para a citocina (PIETENPOL *et al.*, 1990).
8 O gene da ciclina D1 é amplificado em 20% dos casos de câncer de mama (ELLIOTT &
9 BLOBE, 2005).

10 Há várias evidências que indicam que as funções dos TGF- β s dependem da
11 habilidade desses em sinalizar, inativando proto-oncogenes e ativando genes supressores
12 de tumores. Os oncogênese bloqueiam a sinalização dos TGF- β s inibindo a transdução de
13 sinal (ELLIOTT & BLOBE, 2005).

14 Durante a tumorigenese, os TGF- β s estimulam atividades proteolíticas do tecido
15 tumoral, propiciando motilidade às células tumorais (DESRUISSEAU *et al.*, 1996),
16 contudo, um aumento na expressão e nos níveis de TGF- β s resulta em carcinoma invasivo e
17 metástases (MAEHARA *et al.*, 1999).

18 Segundo Soufla *et al.* (2005), o TGF- β 1 é produzido em quantidades basais no
19 epitélio normal, mas o primeiro passo para a transformação e evolução das NICs (I, II e III)
20 é uma gradual e intesa expressão do RNAm dessa isoforma. E a expressão dessa citocina
21 permanece aproximadamente constante entre NIC I e II enquanto que de NIC III para o
22 câncer esta aumenta significativamente. Os TGF- β 2 e β 3 são co-expressos com β 1, mas não

1 encontraram diferenças no nível de expressão associado à evolução e progressão da lesão
2 cervical.

3 O TGF- β 1 é expresso no tecido conjuntivo, endotelial e hematopoiético. TGF- β 2 é
4 expresso no tecido epitelial e células neuronais, e é o mais importante fator regulador da
5 diferenciação celular. TGF- β 3 é expresso principalmente em células mesenquimais (MILLS
6 & MAC GUIRK, 2004; DIAZ-CHAVEZ *et al.*, 2008). Dados estes, que reforçam nossos
7 achados, onde o TGF- β 2 foi a citocina mais freqüentemente expressa, tanto entre o grupo
8 controle quanto entre as pacientes com lesão cervical, porém, nessas verificamos um
9 aumento significativo na expressão dessa citocina, e este aumento se torna ainda mais
10 expressivo nas lesões de alto grau e invasivas.

11 Nossos resultados estão de acordo com os da literatura, onde observamos pouca ou
12 até mesmo ausência de expressão dos TGF- β s nas pacientes do grupo controle (cérvix
13 uterina com epitélio normal), porém um aumento constante, acentuado e significativo na
14 expressão dos TGF- β 1, 2 e 3 à medida que a lesão cervical evolui, apresentando portanto,
15 uma maior proporção na expressão dessas citocinas no grupo das pacientes com lesões
16 invasivas (Gráfico 9).

17 Cui *et al.* (1996), sugeriram que durante a tumorigenese o TGF- β tem atividade
18 promotora e supressora ao mesmo tempo, promovendo a supressão da resposta imune pela
19 inibição da ativação de macrófagos, proliferação e função efetora de células T.

20 Uma distinta subclasse de células T CD4⁺ reguladoras (Treg) da imunidade
21 mediada por células poderiam ser ativadas na presença de grandes quantidades de IL-4,
22 induzindo a produção de TGF- β 1 por essas células nas lesões desses pacientes suscetíveis
23 (O'GARRA, STEINMAN & GIJBELS, 1997).

1 Recentes trabalhos (BARITAKI *et al.*, 2007; ALCOCER-GONZÁLEZ *et al.*, 2006)
2 relacionando a função angiogênica e neo-angiogênica do TGF- β 1 com o nível de expressão
3 dessa citocina imunossupressora em amostras citopatológicas na malignização de células
4 cervicais, demonstram uma estreita associação entre o aumento da expressão da citocina e
5 a progressão da lesão de baixo para alto grau, sendo esta citocina indicada como um
6 biomarcador neoplasia cervical invasiva.

7 O tumor, assim como o estroma de células normais (macrófagos, fibroblastos,
8 mastócitos) secretam grande variedades de fatores de crescimento, os quais ativa a
9 neovascularização. A ação parácrina dos TGF- β s, no estroma das células tumorais, faz
10 com que estas se infiltrem o que pode ser um mecanismo de escape dessas frente ao
11 sistema imune.

12 Resultados semelhantes aos da literatura foram observados no presente trabalho,
13 porém o TGF- β mais freqüente foi primeiro o β 2, seguido pelo β 1 e β 3. Das 5 isoformas
14 descritas, apenas as três primeiras TGF- β 1, 2 e 3, são expressas em mamíferos. TGF- β 2 e
15 β 3 são importantes reguladores da diferenciação celular e afetam o desenvolvimento e a
16 embriogênese, enquanto os efeitos do TGF- β 1 estão mais relacionados com o processo da
17 inflamação (ELLIOTT & BLOBE, 2005). Contudo, os TGF- β s são citocinas
18 imunossupressoras e a deficiência desta citocina pode levar a um processo inflamatório
19 grave e a óbito (SHULL *et al.*, 1990). Os TGF- β s podem tem ações antagônicas, inibindo a
20 expressão de moléculas MHC classe II e ativando TNF- α , IFN- γ e linfotoxina (LT)
21 (TSUNAWAKI *et al.*, 1988). Portanto, independente da isoforma predominante, os TGF-
22 β s favorecem o escape tumoral e conseqüentemente a sua progressão, porém a maioria dos
23 estudos foram realizados com o TGF- β 1.

24 O aumento na expressão e nos níveis dos TGF- β s, associados à resistência dos
25 efeitos dessa citocinas, indica uma progressão tumoral e conseqüentemente um pior

1 prognóstico para pacientes com câncer. De acordo com Song *et al.*, (2002), níveis elevados
2 de TGF- β 1 foram detectados com maior sensibilidade no soro de pacientes com
3 hepatocarcinoma avançado, contudo, a ação sistêmica desses fatores do crescimento, pode
4 talvez, realçadas ou exacerbar outros fatores, como o Fator de Necrose Tumoral - α (TNF-
5 α), que favorece a síndrome da anorexia-caquexia em portadores de neoplasias invasivas.

6 O TGF- β 1 tem ação supressora sobre macrófagos contrapondo os efeitos do IFN- γ
7 na ativação da atividade antimicrobiana mediada pelo óxido nítrico (NO) e inibindo a
8 produção de TNF- α , e dessa forma poderia contribuir para a perpetuação da infecção
9 (BERMUDEZ, 1993; GREEN *et al.*, 1994). Postula-se que a indução precoce do TGF- β 1
10 seria essencial para estabelecer o curso da infecção na ausência de IFN- γ , determinando a
11 proliferação microbiana dentro do macrófago e esta proliferação descontrolada promoveria
12 o desenvolvimento do padrão de resposta Th2 que é observada em algumas pacientes com
13 lesão intraepitelial cervical e neoplasia invasiva, com inibição da resposta Th1 (DOWNEY
14 *et al.*, 2007).

15 Estudos prévios revelaram que as células T regulatórias são potentes inibidores da
16 resposta imune antitumoral e estão associadas com prognóstico desfavorável em diferentes
17 tipos de câncer (WANG, 2006; HIRAOKA *et al.*, 2006; DOWNEY *et al.*, 2007; FECCI *et*
18 *al.*, 2007; FU *et al.*, 2007; MIRACCO *et al.*, 2007). Estes trabalhos demonstraram que a
19 depleção de células Treg CD4⁺ CD25⁺ resultou em uma menor taxa de crescimento do
20 tumor (DOWNEY *et al.*, 2007). Além disso, uma alta prevalência de células T regulatórias
21 tem sido observada no estroma do adenocarcinoma pancreático ductal e estas células estão
22 fortemente correlacionadas com diversos fatores de malignidade como: presença de
23 metástases à distância, grau de proliferação celular avançado e estágio precoce de
24 metástase linfonodal (HIRAOKA *et al.*, 2006). Alguns estudos também têm observado

1 crescente número de células Treg no sangue periférico de pacientes portadores de
2 Carcinoma Escamoso Epidermóide de cabeça e pescoço (STRAUSS BERGMANN &
3 WHITESIDE, 2007; CHIKAMATSU *et al.*, 2007).

4 Em diferentes tipos de cânceres, o aumento de células T positivas para FOXP3,
5 infiltrando no tumor, está associado a um pior prognóstico. No câncer cervical, no câncer
6 de ovário, pulmão e em linfomas, o prognóstico é pronunciado quando se calcula a média
7 entre LT CD8⁺, positivo e negativo para FOXP3, infiltrantes no tumor (GJERDRUM *et al.*,
8 2007; PIERSMA *et al.*, 2007; PIERSMA *et al.*, 2008).

9 Diferentes estudos demonstram que há um balanço entre células TCD8⁺ e CD4⁺
10 positivas para FOXP3, infiltrando em tumores como: carcinoma hepático, linfoma de
11 Hodgkin's e câncer cervical, o que, portanto, demonstra ser um fator independente do
12 prognóstico (KOBAYASHI *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007;
13 JORDANOVA *et al.*, 2008).

14 Com base no exposto, torna-se clara a complexidade e heterogeneidade da resposta
15 imune às neoplasias cervicais, e evidencia-se a importância de mais estudos para uma
16 melhor correlação entre as funções exatas do padrão de citocinas produzidos localmente
17 com o subsequente curso da lesão, a capacidade de manutenção das mesmas para a uma
18 eventual regressão tumoral ou inibição da progressão e a avaliação concomitante dos
19 possíveis componentes das atividades de mecanismos efetores. Mas acreditamos que o
20 presente trabalho vem contribuir de forma significativa em relação aos vários aspectos
21 clínicos e biológicos das neoplasias pré-invasivas e invasivas cervicais.

7 – Resumo dos Resultados

- 1 • A citocina mais prevalente dentre os grupos LSIL/HSIL/Invasivos e controles foi a
2 IL-10;
- 3 • Nas Lesões Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL) não houve um perfil de
4 resposta imune local predominante, a proporção entre Th2 e Treg foi igual
5 (35,71%);
- 6 • Nas Lesões Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) e na Neoplasia Invasiva o
7 perfil de resposta imune local que prevaleceu foi o Treg, com 58,49% e 68%,
8 respectivamente;
- 9 • Houve diferença estatisticamente significante entre o perfil de resposta imune Treg
10 e os outros perfis (Th1, Th2 e indeterminado) de todos os grupos: LSIL, HSIL e
11 Invasivo;
- 12 • O perfil de resposta imune local das pacientes controles foi caracterizado como
13 sendo Th1 em 75% das amostras.

8 – Conclusões

- 1 • A Progressão da lesão é inversamente proporcional ao perfil Th1 ou seja, a resposta
2 imune celular é suprimida a medida que ocorre a progressão da neoplasia; Teve
3 uma redução significativa do perfil Th1 à medida em que a lesão progrediu;
4
- 5 • Houve um aumento do perfil Th2 com relação aos controles, mas com a progressão
6 da lesão este permaneceu estável;
7
- 8 • O perfil Treg teve um aumento constante e significativo à medida que a lesão
9 progrediu;
10
- 11 • Com o aumento do grau da lesão cervical, a resposta imune local se caracteriza em
12 Tregulatório (Treg).
13
- 14 • O desbalanço do padrão de citocinas é que poderiam estar favorecendo a progressão
15 das lesões cervicais.

9 – Referências Bibliográficas

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular & Molecular**. [Trad.] da 6ª ed. Rio de Janeiro – RJ: Elsevier, 2008.
- AHMED, S.M.; AL, H.; REID, W.M.; POULTER, L.W. The cellular response associated with cervical intraepithelial neoplasia in HIV+ and HIV- subjects. **Scand. Jour. Immunol.**, v.56, p.204-211, 2002.
- AKBAR, A.N.; TAAMS, L.S.; SALMON, M.; VUKMANOVIC-STEJIC, M. The peripheral generation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. **Immunology**, v.109, n°3, p.319-25. 2003.
- ALCOCER-GONZÁLES, J.M.; BERUMEN, J.; TAMÉZ-GUERRA, R.; BERMÚDEZMORALES, V.; PERALTA-ZARAGOZA, O.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; MORENO, J.; GARIGLIO, P.; MADRID-MARINA, V. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. **Viral Immunol.**, v. 19, n°3, p. 481-91, 2006.
- AL-SALEH, W.; GIANNINI, S.L.; JACOBS, N.; *et al.* Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. **Jour. Pathol.**, v.184, n°3, p. 283-290, 1998.
- ANNACKER, O.; PIMENTA-ARAÚJO, R.; BURLÉN-DEFRANOUX, O.; BARBOSA, T.C.; CUMANO, A.; BANDEIRA, A.; CD251 CD41 T Cells Regulate the Expansion of Peripheral CD4 T Cells Through the Production of IL-101. **The Jour. Immunol.** v.166, p. 3008–3018, 2001.
- AZAR, K.K.; TANI, M.; YASUDA, H.; SAKAI, A.; INQUE, M.; SASAGAWA, T. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. **Hum. Pathol.** Philadelphia, v. 35, n°11, p. 1376-84, 2004.
- BAIS, AG.; BECKMANN, I.; EWING, PC.; EIJEKEMANS, MJC.; MEIJER, CJ.; SNIJDERS, PJ.; HELMERHORST, TJ. Cytokine release in HR-HPV (+) women without and with cervical dysplasia (CIN II and III) or Carcinoma, compared with HR-HPV (-) controls. **Mediators of Inflammation**, 2007.
- BAIS, AG.; BECKMANN, I.; LINDEMANS, J.; EWING, PC.; MEIJER, CJ.; SNIJDERS, PJ.; HELMERHORST, TJ. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. **Jour. Clin. Pathol.**, London, v. 58, n°10, p. 1096-100, 2005.
- BALLESTRERO, A.; BOY, D.; MORAN, E.; CIRMENA, G.; BROSSART, P.; NENCIONI, A. Immunotherapy with dendritic cells for cancer. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.60, p. 173-183, 2008.

- BARITAKI, S.; SIFAKIS, S.; HUERTA-YEPEZ, S.; NEONAKIS, IK.; SOUFLA, G.; BONAVIDA, B.; SPANDIDOS, DA. Over expression of VEGF and TGF- β 1 m-RNA in Pap smears correlates with progression of cervical intraepithelial neoplasia to cancer: Implication of YY1 in cervical tumorigenesis and HPV infection. **Int Jour. Oncol.**, Athens, v. 31, nº1, p. 69-79, 2007.
- BAUER, S.; GROH, V.; WU, J.; STEINLE, A.; PHILLIPS, J.H.; LANIER, L.L.; SPIES, T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stressinducible MICA. **Science**, Washington, v. 285, p. 727-729, 1999.
- BERMUDEZ, L.E. Production of transforming growth factor- β by Mycobacterium avium-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to INF- γ . **Jour. Immunol.** v.150, p.1838-1845, 1993.
- BOR-CHING SHEU, RONG-HWA LIN, HUANG-CHUN LIEN, HONG-NERNG HO SU-MING HSU AND SU-CHENG HUANG. Predominant Th2/Tc2 Polarity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Human Cervical. Cancer. **The Jour. Immunol.**, v.167, p.2972-2978, 2001.
- BOSCH, F. X; MUÑOZ, N; DE SANJOSÉ, S; IZARZUGAZA, I; GILI, M; VILADIU, P; TORMO, M. J; MOREO, P; ASCUNCE N; GONZALEZ, L, C. Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. **Jour. Nat. Cancer Inst.** nov. 1992.
- BRODERS, A.C. Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium. **Jour. Am. Med. Assoc.**, v.99, p.1670-1932, 1932.
- CAVALCANTI SM, ZARDO LG, PASSOS MR, OLIVEIRA LH. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. **Jour. Infect.**, v.40, nº1, p.80-87, 2000.
- CAVALCANTI, S. M. B.; PASSOS, J. V. M.; RAMOS, L. M. *et al.* Human papillomavirus infection and p53 over expression associated to cervical cancer. **J. Bras. Patol.**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 4, p. 257-62, out./dez., 2000.
- CHAPUT N, DARRASSE-JEZE G, BERGOT AS, CORDIER C, NGO-ABDALLA S, KLATZMANN D, *et al.* Regulatory T cells prevents CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 th cells at tumor sites. **Jour. Immunol.**v.179, p.4969, 2007.
- CHAVES, J.E, *et al.* Carcinoma do Colo Uterino. **Manual de Avaliação pré-tratamento e seguimento.** Porto Alegre, Centro de Aperfeiçoamento das Equipes de Saúde (CEAPES-HMIPV), 1984.
- CHEN, J. R.; LEE, Y. J.; CHEN, T.; WANG, K. L.; DANG, C. W.; CHANG, S. C.; LIU, H. F.; YANG, Y. C. MHC class i chain-related gene a (MICA) polymorphism and the different histological types of cervical cancer, **Neoplasma**, Bratislava, v.52, n.5, p. 369-73, 2005.
- CHEN, L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v.4, nº5, p.336-347, 2004.

- CHIKAMATSU, K.; SAKAKURA, K.; WHITESIDE, T.L.; FURUYA, N. Relationships between regulatory T cells and CD8⁺ effector populations in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head Neck**, v.29, n°2, p.120-127, 2007.
- CLERICI, M & SHEARER, G.M. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. **Immunol. Today**, v.15, p. 575-581, 1994.
- CLERICI, M.; MEROLA, M.; FERRARIO, E.; *et al.* Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. **Jour. Natl. Cancer Inst.**, v.89, p. 245-250, 1997.
- CLERICI, M.; SHEARER, GM, CLERICI E. Cytokine dysregulation in invasive cervical carcinoma and other human neoplasias: time to consider the TH1/TH2 paradigm. **Jour. Natl. Cancer Inst.** v. 90, p.261–263, 1998.
- COFFEY, R. J.; JR, C. C.; BASCOM, N. J.; SIPES, R.; GRAVES-DEAL, B.; WEISSMAN, E.; MOSES, H. L. Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor P. **Mol. Cell. Biol.** v.8, p.3088-3093, 1988.
- CUI, W.; FOWLIS, D.J.; BRYSON, S.; *et al.*: TGF-beta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. **Cell.** v.86, p.531-542, 1996.
- DAVIDSON, B.; GOLDBERG, I.; KOPOLOVIC, J. Inflammatory response in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Pathol. Res. Practice**, New York, v. 193, n. 7, p. 491-5, 1997.
- DAVIDSON, T. S.; RICHARD, J.; DIPAOLO, J.; ANDERSSON, J.; ETHAN, M.; SHEVACH, M. Cutting Edge: IL-2 Is Essential for TGF- β Mediated Induction of Foxp3₊ T Regulatory Cells. **The Jour. Immunol.**, v.178, p.4022–4026, 2007.
- DE VILLIERS, E.M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H.U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology.** v.324, p.17–27, 2004.
- DEL VECCHIO, M.; BAJETTA, E.; CANOVA, S.; LOTZE, M.; PARMIANI, A. G.; & ANICHINI, A. Interleukin-12: Biological Properties and Clinical Application. **Clin. Cancer Res.** v.3, n°16, p. 4677 – 4685, 2007.
- DESRUISSEAU, S.; GHAZAROSSIAN-RAGNI, E.; CHINOT, O.; *et al.*: Divergent effect of TGF-beta1 on growth and proteolytic modulation of human prostatic-cancer cell lines. **Int. Journ. Cancer.** v.66, p.796-801, 1996.
- DIAZ-CHAVEZ, J.; HERNANDEZ-PANDO, R.; LAMBERT, P. F.; GARIGLIO, P. Down-regulation of transforming growth factor- β type II receptor (TGF- β RII) protein and mRNA expression in cervical cancer. **Mol. Cancer**, v.7, n°3, 2008.
- DIECKMANN, D.; BRUETT, C.H.; PLOETTNER, H.; LUTZ, M.B.; SCHULER, G. Human CD4(+)/CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-

- producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. **Jour. Exp. Med.**, v.196, p.247-253, 2002.
- DOWNEY, S.G.; KLAPPER, J.A.; SMITH, F.O.; YANG, J.C.; SHERRY, R.M.; ROYAL, R.E.; *et al.* Prognostic factors related to clinical response in patients with metastatic melanoma treated by CTL-associated antigen-4 blockade. **Clin. Cancer Res.** v.13, n°22, p.6681-6688, 2007.
- DUARTE, I.; SANTOS, A.; SOUSA, H.; CATARINO, R.; PINTO, D.; MATOS, A.; PEREIRA, D.; MOUTINHO, J.; CANEDO, P.; MACHADO, J.C.; MEDEIROS, R. G-308 TNF- α polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 334, p. 558-592, 2005.
- ELLERBROCK, T.V.; CHIASSON, M.A.; BUSH, T.J.; *et al.* Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. **JAMA**, v.283, n°8, p. 1031-1037, 2000.
- ELLIOTT, R. & BLOBE, G.C. Role of Transforming Growth Factor Beta in Human Cancer. **Jour. Clin. Oncol.** v.23, p. 2078-2093, 2005.
- ELLIS, J.R.; KEATING, P.J.; BAIRD, J.; HOUNESLL, E.F.; RENOUF, D.V.; ROWE, M.; *et al.* The association of an HPV 16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine desing in cervical cancer. **Nat. Med.**, v.5, p. 464-470, 1995.
- EL-SHERIF, A.M.; SETH, R.; TIGHE, P.J.; JENKINS, D. Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. **Jour. Pathol.**, v.195, p.179-185, 2001.
- ERMANN, J.; SZANYA, V.; FORD, G.S.; PARAGAS, V.; FATHMAN, C.G.; LEJON, K. CD4(+)CD25(+) T cells facilitate the induction of T cell anergy. **Jour. Immunol.**, v.167, p.4271-5, 2001.
- EVANS, E. M.; MAN, S.; EVANS, A. S.; BORYSIEWICZ, L. Z. Infiltration of cervical cancer tissue with human papilomavírus-specific cytotoxic T-lymphocytes. **Cancer Res.** v.57, p. 29-43, 1997.
- EVANS, M. F.; ADAMSON, C.; PAPILO, J. L.; JOHN, T. L.; LEIMAN, G.; COOPER, K. Distribution of human papillomavirus types in thin Prep Papanicolaou Tests Classified According to the Bethesda 2001 Terminology and correlations with Patient Age and Biopsy outcomes. **Cancer**, v. 106, n. 5, p. 1054-1064, 2006.
- FECCI, P.E.; OCHIAI, H.; MITCHELL, D.A.; GROSSI, P.M.; SWEENEY, A.E.; ARCHER, G.E.; *et al.* Systemic CTLA-4 blockade ameliorates glioma-induced changes to the CD4+ T cell compartment without affecting regulatory T-cell function. **Clin. Cancer Res.**, v.13, n°7, p.2158-2167, 2007.
- FERNANDES, A.P.M.; GONÇALVES, M.A.G.; SIMÕES, R.T.; QUINTANA, S.M.; DUARTE, G.; DONADI, E.A. Influência do HPV-16 sobre a produção intralesional de IL-10 em mulheres imonogeneticamente responsivas e portadoras do HIV-1. **Jour. Bras. Doenças Sex. Transm.**, v. 16, n°3, p. 67-72, 2004.

- FERRANTINI, M.; CAPONE, I.; BELARDELLI, F.; Dendritic cells and cytokines in immune rejection of cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. n. 19, p. 93-107, 2008.
- FONG, L. & ENGLEMAN, E. Dendritic cells in cancer immunotherapy. **Annu. Rev. Immunol.** v. 18, p. 245-273, 2000.
- FU, J.; XU, D. ; LIU, Z. ; SHI, M. ; ZHAO, P. ; FU, B. ; *et al.* Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. **Gastroenterology**, v.132, n°7, p.2328-2339, 2007.
- GAO, Q.; QUI, S.J.; ZHOU, J.; WANG, X.Y., XIAO, Y.S.; *et al.* Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cell is association. **Jour. Clin. Oncol.**, v.25, p.2586, 2007.
- GARZETTI, G.G.; CIAVATTINI, A.; MUZZIOLI, M.; GOTERI, G.; MANNELLO, B.; ROMANINI, C.; FABRIS, N. Natural killer cell activity in patients with invasive cervical carcinoma: importance of a longitudinal evaluation in follow-up. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 40, n°2, p. 133-138, 1995.
- GIANNINI, S.L. ; HUBERT, P. ; DOYEN, J. ; BONIVER, J. ; DELVENNE, P. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. **Int. Jour. Cancer**, v.97, n°5, p. 654-659, 2002.
- GIANNINI, S.L.; AL-SALEH, W.; PIRON, H.; *et al.* Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. **Clin. Exp. Immunol.**, v.113, p.183-189, 1998.
- GILBOA, E. DC-based cancer vaccines. **The Jour. Clin. Invest.** v. 117, n. 5, p. 1195-1203, 2007.
- GJERDRUM, L. M.; WOETMANN, A.; ODUM, N.; BURTON, C. M.; ROSSEN, K.; SKOVGAARD, G.L. *et al.*, FOXP3+ regulatory T cells in cutaneous T-cell lymphomas: association with disease stage and survival. **Leukemia**, v.21, p. 2512, 2007.
- GONCALVES, M. A. & DONADI, E. A immune cellular response to HPV: current concepts. **Braz. Jour. Infect. Dis.**, Salvador, v. 8, n. 1, p. 1-9, fev. 2004.
- GRAVITT, P.E.; HILDESHEIM, A.; HERRERO, R.; SCHIFFMAN, M.; SHERMAN, M.E.; BRATTI, M.C.; RODRIGUEZ, A.C.; MORERA, L.A.; CARDENAS, F.; BOWMAN, F.P.; SHAH, K.V.; CROWLEY-NOWICK, P.A. Correlates of IL-10 e IL-12 concentrations in cervical secretions. **Jour. Clin. Immunol.**, v. 23930, p. 175-83, 2003.
- GREEN, E.A., GORELIK, L., MCGREGOR, C.M., TRAN, E.H., AND FLAVELL, R.A. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.100, p.10878–10883, 2003.

- GREEN, J.S.; SCHELLER, L.F.; MARLETTA, M.A.; SEGUIN, M.C.; KLOTZ, F.W.; SLAYTER, M.; NELSON, B.J.; NANCY, C.A. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. **Immunol. Let.** v.43, p.87-94, 1994.
- GUZMÁN-ROJAS, L.; ALCOCER-GONZÁLEZ, J.M.; MADRID-MARINA, V. Perspectivas para el desarrollo de vacunas e inmunoterapia contra cáncer cervicouterino. **Salud Publica Mex.**, v.40, p.38-46, 1998.
- HAGARI, Y.; BUDGEON, L.R.; PICKEL, M.D.; KREIDER, J.W. Association of tumor necrosis factor-alfa gene expression and apoptotic cell death with regression of Shope papillomas. **Jour. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v. 104, p. 526-529, 1995.
- HANAHAN, D.; LANZAVECCHIA, A.; MIHICH, E.; Fourteenth Annual Pezcoller Symposium: the novel dichotomy of immune interactions with tumors. **Cancer Res.**, v.63, nº11, p.3005-3008, 2003.
- HAUSER, S.L. Tumor necrosis factor: immunogenetics and disease. **Ann. Neurol.**, Boston, v. 38, p. 702-704, 1995.
- HAZELBAG, S. *et al.* Cytokine profile of cervical cancer cells. **Gynecology Onc.**, New Cork, v.83, n.2, p. 235-243, 2001.
- HERBST, A. L., *et al.* **Comprehensive Gynecology**. 2a. ed. St. Louis, Mosby Year Book, pp. 821-859, 1992.
- HIRAOKA, N.; ONOZATO, K.; KOSUGE, T.; HIROHASHI, S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. **Clin. Cancer Res.**, v.12, nº18, p.5423-5434, 2006.
- HUANG, S. L.; CHAO, A.; HSUEH, S.; CHAO, F. Y.; HUANG, C. C.; YANG, J. E.; LIN, C. Y.; YAN, C. C.; CHOU, H. H.; HUANG, K. G.; HUANG, H. J.; WU, T. I.; TSENG, M. J.; QIU, J. T.; LIN, C. T.; CHANG, T. C.; LAI, C. H. Comparison between the Hybrid Capture II Test and an SPF1/GP6+ PCR-Based Assay for Detection of Human Papillomavirus DNA in Cervical Swab Samples. **Jour. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 5, p. 1733-1739, 2006.
- HUTCHINSON, I.V.; PRAVICA, V.; HAJEER, A.; SINNOTT, P.J. Identification of high and low responders to allografts. **Rev. Immunogenet.**, v.1, p.323-333, 1999.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde - Brasil. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer de colo de útero**, 2008 – 2009. www.inca.org.br
- JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; STASSEN, M.; TUETTENBERG, A.; KNOP, J.; ENK, A.H. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. **Jour. Exp. Med.**, v.193, p.1285-1294, 2001.

- JORDANOVA, E.S.; GOERTR, A.; AYACHI, O.; PRINS, F.; DURRANT, L.G.; KENTER, G.G.; *et al.* HLA Class I, MICA and CD8+ regulatory T-cell ratio: which parameter determines survival of cervical cancer patients? **Clin. Cancer Res.** v.1, 2008.
- KIRKPATRICK, A.; BIDWELL, J.; VAN DEN BRULE, A.J.C.; MEIJER, C.J.L.M.; PAWADE, J.; GLEW, S. TNF- α polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 92, p. 675-679, 2004.
- KOBAYASHI, A.; GREENBLATT, R. M.; ANASTOS, K. *et al.* Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. **Cancer Res.**, Chicago, v. 64, n. 18, p. 6766-74, set. 2004.
- KOBAYASHI, N.; HIRAOKA, N.; YAMAGAMI, W.; OJIMA, H.; KANIA, Y.; *et al.* FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of the hepatocarcinogenesis. **Clin. Cancer Res.**, v.13, p.902, 2007.
- KONO, K.; RESSING, M.E.; BRANDT, M.R. Decreased expression of signal transducing zeta chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. **Clin. Cancer Res.**, v.2, p.1825-1828, 1996.
- KURMAN, R. J.; SOLOMON, D. **The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses.** Bethesda: Springer-Verlag, 1994. 81p.
- KURMAN, R.J. & MALKASIAN, G.D.; SEDLIS, A.; SOLOMON, D. From Papanicolaou to Bethesda: the rationale for a new clinical cytologic classification. **Obstet. Gynecol.**; v.77, p. 779-782, 1991.
- KURMAN, R.J.; SOLOMON, D. **The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses.** Springer-Verlag, 1994.
- LEE, A.M.; CLEAR, A.J.; CALAMINICI, M.; *et al.* Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3- positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. **Jour. Clin. Oncol.** v.24, p.5052-5059, 2006.
- LEE, B.N.; FOLLEN, M.; SHEN, D.Y.; MALPICA, A.; ADLER-STORTHZ, K.; SHEARER, W.T.; REUBEN, J.M. Depressed type 1 cytokine synthesis by super antigen-activated CD4+ T cells of women with human papillomavirus-related highgrade squamous intraepithelial lesions. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v. 11, n°2, p. 239-244, 2004.
- LEE, C. H., CHOI, Y. H., YANG, S. H., LEE, C. W., HA, S. J., SUNG, Y. C. Hepatitis C virus core protein inhibits interleukin 12 and nitric oxide production from activated macrophages. **Virology**, v.279, p. 271-279, 2001.
- LIMA, H.C. Role of regulatory T cells in the development of skin diseases. **An. Bras. Dermatol.** V.81, n°3, p.269-281, 2006.

- LINSINGEN, R. V. **Polimorfismos de genes de citocinas e do gene *mica* em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical**. 124f.: Dissertação (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, 2008.
- LONGWORTH MS, LAIMINS LA. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. **Microbiol Mol Biol Rev.** v.68, no.2, p. 362-372, 2004.
- MAEHARA, Y.; KAKEJI, Y.; KABASHIMA, A.; *et al*: Role of transforming growth factor-beta 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma. **Jorn. Clin. Oncol.** v.17, p.607-614, 1999.
- MAGGI, R.; ZANNONI, E.; GIORDA, G.; BIRAGHI, P.; SIDERI, M. Comparison of repeat smear, colposcopy, and colposcopically directed biopsy in the evaluation of the mildly abnormal smear. **Gynecol Oncol.**, v. 35, p. 294-296, 1989.
- MALEJCZYK, M.; JOŹWIĄK, J.; OSIECKA, A.; *et al*. Serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors in patients with benign and malignant HPV-associated anogenital lesions. **Int. Jour. Cancer.** v.73, p.16-19, 1997.
- MATSUDA M, SALAZAR F, PETERSSON M, MASUCCI G, HANSSONJ, PISA P, *et al*. Interleukin 10 pretreated protects target cells from tumor and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. **Jour. Exp. Med.**, v.180, p.2371-2376, 1994.
- MILLS, K.H.G. & MAC GUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells—their induction and role in infection. **Seminars in Immunology**, v.16, p.107-117, 2004.
- MIRACCO, C.; MOURMOURAS, V.; BIAGIOLI, M.; RUBEGNI, P.; MANNUCCI, S.; MONCIATTI, I.; *et al*. Utility of tumour-infiltrating CD25+FOXP3+ regulatory T cell evaluation in predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma. **Oncol. Rep.**, v.18, n°5, p.1115-1122, 2007.
- MOCELLIN, S.; MARINCOLA, F.; YOUNG, H.A. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. **Jour. Leukoc. Biol.**, New York, v. 78, p. 1043-51, 2005.
- MOSCICKI, A.B.; SHIBOSKI, S.; BROERING, J.; POWELL, K.; CLAYTON, L.; JAY,N.; *et al*. The natural history of the human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing and adolescent and young women. **Jour. Pediatr.**, St. Louis, v. 132, p. 277-84, 1998.
- MOSMANN, T.R. & COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann Rev Immunol**, Palo Alto, v. 7, p. 145-173, 1989.
- MUNÓZ, N.; BOSCH F.X.; DE SANJOSE, S.; VILADIU, P.; TORMO, J.; MOREO, P. *et al*. Human Papillomavirus in the etiology of cervico-uterine cancer. **Bol. Oficina Sanit. Panam.**, v.115, p.301-309, 1993.

- MUNÓZ, N.; Bosch FX, Sanjosé S, Shah KV. The role of HPV in the etiology of cervical cancer. *Mutat. Res.* v.305, p.293-301, 1994.
- NAGLER-ANDERSON, C.; BHAN, A.K.; PODOLSKY, D.K.; TERHORST, C. Control freaks: immune regulatory cells. *Nat. Immunol.* v.5, p.119-22, 2004.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE WORKSHOP. (1993) The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: revised after the second National Cancer Institute Workshop, April 29-30, 1991. *Acta Cytol.*, 37, 115-124.
- NICOLAU, S, M. Peniscopía. In: HALBE H. W, **Tratado de ginecología**, 3ed, São Paulo: Roca,. p.531-539, v.1. 2000.
- NISHIMURA, E.; SAKIHAMA, T.; SETOGUCHI, R.; TANAKA, K.; SAKAGUCHI, S. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.*, v.16, p.1189-1201, 2004.
- NIWA, Y.; AKAMATSU, H.; NIWA, H.; SUMI, H.; OZAKI, Y.; ABE, A. Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course I patients with breast and cervical cancer. *Clin. Cancer. Res.*, Denville, v. 7, p. 285-9, 2001.
- O'GARRA, A.; STEINMAN, L. & GIJBELS, K. CD4⁺ T-cell subsets in autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v.9, p.872-883, 1997.
- OLIVEIRA-NETO, H.H.; LEITE, A.F.; COSTA, N.L.; ALENCAR, R.C.; LARA, V.S.; SILVA, T.A.; *et al.* Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: possible failure in the migration of these cells. *Oral Oncol.*, v.43, nº5, p.484-490, 2007.
- PALO, G., *et al.* **Patologia e Tratamento do Trato Genital Inferior (Incluindo Colposcopia)**. MEDSI Editora Médica e Científica Ltda. Cap.1, pp. 97, 104, 2002.
- PAO, C.C.; LYN, C.Y.; YAO, D.S.; TSENG, C.J. Differential expression of cytokines in cervical cancer tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, New York, v. 214, nº3, p. 1146-1151, 1995.
- PARDO-GOVEA, T.; CALLEJAS, D.; NÚÑEZ-TROCONIS, J.; ARAUJO, M.; COSTA, L.; PONS, H.; DELGADO, M.; MONSALVE, F. expression de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 em células de neoplasias intraepiteliais de cuello uterino: Reporte preliminar. *Invest. Clin.*, Maracaibo, v. 46, nº1, p.5-13, 2005.
- PAUL, W.E. & SEDER, R.A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell.*, v.76, p.241-251, 1994.
- PEREYRA, E. A. G; GUERRA, D. M. M; VILLA, L. L. Papilomavíruses humanas, In: R. VERONESI, R, FOCACCIA, **Tratado de infectologia**, 2ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p.479-485.

- PETRY, K.U.; SCHEFFEL, D.; BODE, U.; et al. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. **Int. J. Cancer**, v.57, p. 836-840, 1994.
- PICCIRILLO, C. A. & SHEVACH, E. M. Cutting edge: control of CD8_ T cell activation by CD4_CD25_ immunoregulatory cells. **Jour. Immunol.** v.167, p.11-37, 2001.
- PIERSMA, S.J.; JORDANOVA, E.S.; VAN POELGEEST, M.I.; KWAPPENBERG, K.M.; VAN DER HULST, J.M.; DRIJFHOUT, J.W.; *et al.* High number of intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. **Cancer Res.**, v.67, p. 354, 2007.
- PIERSMA, S.J.; WELTERS, M.J.P.; VAN DER BURG, S.H. Tumor-specific regulatory T cell in cancer patients. **Human Immunol.**, v.69, p.241-249, 2008.
- PIETENPOL, J.A; STEIN, R.W, MORAN, E. *et al*: TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains. **Cell.** v.61, p.777-785, 1990.
- PINTO, A. P; TULIO, S; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. **Revista da Associação de Medicina Brasileira.** v.48, n.1, p.73-78, jan.mar. 2002.
- PINTO, L.A.; CASTLE, P.E.; RODEN, R.B.; HARRO, C.D.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. et al. HPV-16 LI VLP vaccine elicits a broad-spectrum of cytokine responses in whole blood. **Vaccine**, Amsterdam, v. 23, p. 3555-64, 2005.
- POPPE, W.A.; DRIJKONINGEN, M.; IDE, P.S.; LOWERINS, J.M.; VAN ASSCHE, F.A. Langerhans' cells and L1 antigen expression in normal and abnormal squamous epithelium of the cervical transformation zone. **Gynecol. Obstet. Invest.**, Basel, v. 41, nº3, p. 207-13, 1996.
- RAFIQ, K.; CHARITIDOU, L.; BULLENS, D.M.; KASRAN, A.; LORRE, K.; CEUPPENS, J.; VAN GOOL, S.W. Regulation of the IL-10 production by human T cells. **Scand. Jour. Immunol.**, Oslo, v. 53, nº2, p. 139-47, 2001.
- REAGAN, J.W., SEIDERMAN, I.L., & SARACUSA, Y. The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix. **Cancer**, v.6, p.224-235, 1953.
- REICHERT, T. E.; RABINOWICH, H.; JOHNSON, J. T.; WHITESIDE, T. L. Immune cells in the tumor microenvironment: mechanisms responsible for significant and functional defects. **Jour. Immunother.**, v.;21, p. 295-306, 1998.
- RICHART, R. M.; SHINGLETON, H. M.; WIENER, J.; SPIRO, D. Human cervical intraepithelial neoplasia: fine structure of dysplasia and carcinoma in situ. **Cancer Res.**, v.28, n °4, p.695-706, 1968.
- RICHART, R.M. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. **Obstet. Gynecol.**, v. 75, nº1, p.131-133, 1990.

- SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **Jour. Immunol.**, v.155, p.1151- 1164, 1995.
- SCOTT, M.; STITES, D.P.; MOSCICKI, A.B. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v. 6, p. 751-5, 1999.
- SCOTT, ME.; MA, Y.; FARHAT, S.; SHIBOSKI, S.; MOSCICKI, A.B. Covariates of cervical cytokines mRNA expression by real time PCR in adolescents and young women: effects of Chlamydia trachomatis infection, hormonal contraception and smoking. **Jour. Clin. Immunol.**, New York, v. 26, n°3, p. 222-223, 2006.
- SELLORS, J.W.; SANKARANARAYANAN, D. R. **Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical**. Edited by R. Sankaranarayanan and Ramani S. Wesley. p. 52-80, 2004.
- SHERMAN, M. E.; CASTLE, P. E.; SOLOMON, D. Cervical Cytology of Atypical Squamous Cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H) Characteristics and Histologic Outcomes. **Cancer Cytopathol.**, v. 108, n. 5, p. 298-305, 2006.
- SHEU, B.C.; LIN, H.H.; CHANG, D.Y.; *et al.* The potential of serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor I as a biochemical marker in cervical cancer. **Br. Jour. Obstet. Gynaecol.**v.104, p.1314–1319, 1997.
- SHEVACH, E.M. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. **Nat. Rev. Immunol.**, v.2, p. 389-400, 2002.
- SHEVACH, E.M. Regulatory T cells in autoimmunity. **Annu. Rev. Immunol.** v.18, p.423–449, 2000.
- SHULL, M.M.; ORMBBSBY, I.; KIER, A.B. *et al.* Targeted disruption of mouse TGF- β 1. Gene results in multifocal inflammatory disease, **Nature**, London, v.359, p. 693-696, 1990.
- SIELING, P.A. & MODLIN, R.L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. **Immunobiology**, v.191, p.378-387, 1994.
- SOLOMON, D. The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Developed and approved at the National Cancer Institute Workshop, Bethesda, Maryland, USA, December, 12-13. **Acta. Cytol.**, v.33, p.567-574, 1989.
- SOLOMON, D.; DAVEY, D.; KURMAN, R.; MORIARTY, A.; O'CONNOR, D.; PREY, M. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**. Apr. 24, n°287, v.16, p.2114-2119, 2002.

- SONG, B.C.; CHUNG, Y.H.; KIM, J.A.; *et al.*: Transforming growth factor-beta1 as a useful serologic marker of small hepatocellular carcinoma. **Cancer**. v. 94, p.175-180, 2002.
- SOUFLA, G.; SIFAKIS, S.; BARITAKI, S.; ZAFIROPOULOS, A.; KOUMANTAKIS, E.; SPANDIDOS, D. A. VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix. **Cancer Letters**, v.22, p.105-118, 2005.
- SOUZA, J. H. K.; KALIL, I. V.; LEITE, J. M.; GEBER, S. Avaliação de lâminas de colpocitologia oncótica previamente diagnosticadas como ASCUS: comparação interensaios e interobservadores. **Rev. Brás. de Ginecol. e Obstet.**, v. 26, n. 3, p. 233-240, 2004.
- SURI-PAYER, E. & CANTOR, H. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells. **J Autoimmun.**, v.16,p.115-123, 2001.
- STANCZUK, G.A.; SIBANDA, E.N.; PERREY, C.; CHIRARA, M.; PRAVICA, V.; HUTCHINSON, I.V.; TSWANA, S.A. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with gene polymorphism coding for increased IL-10 production. **Int. Jour. Cancer**, New York, v. 94, nº6, p. 792-4, 2001.
- STANLEY, M. A. Immunobiology of papillomavirus infections. **Jour. Report. Immunol.** v. 52, p. 45-59, 2001.
- STANLEY, M. Chapter 17: Genital Human Papillomavirus Infections — Current and Prospective Therapies. **Jour. Natl. Cancer Inst. Monogr.** v. 31, p. 117–124, 2003.
- STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecologic. Onc.** n. 109, p.S15 – S21, 2008.
- STIEPCICH, M. O papel do HPV no câncer cervical. **Dis Markers**. v. 17, no.3, p.123-128, 2000.
- STRAUSS, L.; BERGMANN, C. & WHITESIDE, T.L. Functional and phenotypic characteristics of CD4+CD25highFoxp3+ Treg clones obtained from peripheral blood of patients with cancer. **Int. Jour. Cancer**. v.121, nº11, p.2473-2483, 2007.
- STRAUSS, L.; CHRISTOPH, BERGMANN, SZCZEPANSKI, M.; GOODING, W.; JONAS, T. JOHNSON, AND THERESA, L. Whiteside Unique Subset of CD4+CD25highFoxp3+ T Cells Secreting Interleukin-10 and Transforming Growth Factor β 1 Mediates Suppression in the Tumor Microenvironment. **Clin. Cancer. Res.** nº13, v.15, Aug., p.4345- 4354, 2007.
- TARTOUR, E.; GEY, A.; SASTRE-GARAU, X.; *et al.* Analysis of interleukin-6 gene expression in cervical neoplasia using a quantitative polymerase chain reaction assay: evidence for enhanced interleukin 6 gene expression in invasive carcinoma. **Cancer Res.**, nº54, v.23, p. 6243-6248, 1994.

- TAY, S.K.; JENKINS, D.; MADDOX, P.; CAMPION, M.; SINGER, A. Subpopulation of the Langerhans' cells in cervical neoplasia. **Br. Jour. Obstet. Gynaecol.**, London, v. 94, p. 10-15, 1987.
- TIMMERMAN, J. M. & LEVY, R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. **Annu. Rev. Med.** v. 50, p. 507-529, 1999.
- TJONG, M.Y.; VAN DER VANGE, N.; TEN KATE, FJ.; TJONG-A-HUNG, SP.; TER SCHEGGET, J.; BURGER, MP. Increased IL-6 e IL-8 levels in cervico vaginal secretions of patients of cervical cancer. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 73, p. 285-91, 1999.
- TYRING SK. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. **Jour. Am. Acad. Dermatol.**, v.43, p.518-526.,2000.
- TRINCHIERI, G. & SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nat. Rev. Immunol.**,v.7, p.179-190, 2007.
- TRIPATHY, N.K.; CHAUHAN, S.K.; & NITYANAND, S. Cytokine mRNA repertoire of peripheral blood mononuclear cells in Takayasu's arteritis. **Clin. Exp. Immunol.** 2004 November; v.138, n°2, p.369–374, 2004.
- TSUKUI, T.; HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M.H.; *et al.* Interleukin - 2 production *in vitro* by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 56, p. 3967-74, 1996.
- TSUNAWAKI, S.; SPORN, M.; DING, A.; NATHAN, C. Desatiation of macrophages by transforming growth factor- β . **Nature**, v. 334, p. 260,1988.
- VAN der BURG, S.H.; PIERSMA, S.J.; DE JONG, A.; VAN DER HULST, J.M.; *et al.* Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 1287, 2007.
- VENCE, L.; PALUCKA, A.K.; FAY, J.W.; ITO, T.; LIU, Y.J.; BANCHEREAU, J.; *et al.* Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.104, p.208-284, 2007.
- VOLPE, E.; SERVANT, N.; ZOLLINGER, R.; *et al.* A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. **Nat. Immunol.**, v.9, p.650-657, 2008.
- WAN, Y.Y. & FLAVELL, R.A. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. **Nature**, v.445, p.766-770, 2007.
- WANG, H.Y.; LEE, D.A.; PENG, G.; GUO, Z.; LI, Y.; KINIWA, Y. *et al.*; Tumor-specific human CD4⁺ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. **Immunity.**, v.20, n°1, p.107-118, 2004.

- WANG, J.; IOAN-FACSINAY, A.; VAN DER VOORT, E.I.; HUIZINGA, T.W.; TOES, R.E. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells. **Eur. Jour. Immunol.** v.37, p.129–138, 2007.
- WANG, S.S.; HILDESHEIM, A. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. **J. Natl. Cancer Inst. Monogr.** v.31, p.35-40, 2003.
- WATANABE, Y. & JACOB, C.O. Regulation of MHC class II antigen expression. Opposing effects of tumor necrosis factor- α on IFN- γ -induced HLA-DR and Ia expression depends on the maturation and differentiation stage of the cell. **Jour. Immunol.**, Bethesda, v. 146, p. 899-905, 1991.
- WEAVER, C.T.; HARRINGTON, L.E.; MANGAN, P.R.; GAVRIELI, M.; MURPHY, K.M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. **Immunity.** v.24, p.677-688, 2006.
- WEI, L. H.; KUO, M. L.; CHEN, C. A.; CHENG, W. F.; CHENG, V. S. P.; HSIEH, F. J.; HSIEH, C. Y. Interleukin-6 in cervical cancer: the relationship with vascular endothelial growth factor. **Gynecol. Oncol.**,v 82,p.49-56, 2001.
- WEI, W.Z.; MORRIS, G.P. & KONG, Y.C. Anti-tumor immunity and autoimmunity: a balancing act of regulatory T cells. **Cancer Immunol. Immunother.**, v.53, n^o2, p.73-78, 2004.
- WESA, A.; KALINSKI, P.; TATSUMI, T.; *et al.* Polarized type-1 dendritic cells (DC1) producing high levels of IL-12 family members rescue patient Th1-type anti-melanoma CD4⁺ T cell responses in vitro. **Jorn. Immunother.** n^o30, p.75 – 82, 2007.
- WHO.IARC. **Monographs on the evaluation and carcinogenic risks to human.** Human Papillomavirus. Lyon, p. 64, 1995.
- WILLIAMS, L.M. & RUDENSKY, A.Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. **Nat. Immunol.** v.8, p.277-284, 2007.
- WOODWORTH, C.G. & SIMPSON, S. Comparative lymphokine secretion by cultured normal cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized and carcinoma cell lines. **Am. Jour. Pathol.**, Philadelphia, v. 142, p. 1544-55, 1993.
- WU R., COLEMAN N., HIGGINS G. Lymphocyte-mediated cytotoxicity to HPV 16 infected cervical keratinocytes. In: Stanley, M.A. **Immunology of Human Papillomaviruses.** Plenum Press, New York, p. 255-9, 1994.
- WU, R.; COLEMAN, N.; STANLEY, M. Different susceptibility of cervical keratinocytes containing human papillomavirus to cell-mediated cytotoxicity. **Chin. Méd. J.** v. 109, no.11, p.854-858, 1996.
- YAMAGUCHI, T. & SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. **Semin. Cancer Biol.**,v.16, n^o2, p.115-123, 2006.

- ZHENG, Y., AND RUDENSKY, A.Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. **Nat. Immunol.** v.8, p.457–462, 2007.
- ZHOU, G. & LEVITSKY, Y. H. I. Natural regulatory T cells and de novo induced regulatory T cells contribute independently to tumor specific tolerance. **J. Immunol.**, v.178, p.21-55, 2007.
- ZHU, J. & PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **BLOOD**, v.112, n°5, p.1557-1569, Set.1, 2008.
- ZITVOGEL, L.; TESNENIERE, A. & KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **Tumour Immunol.** v. 6, Oct. p. 715-727, 2006.
- ZOODSMA, M.; NOLTE, I.M.; SCHIPPER, M.; OOSTEROM, E.; VAN DER STEEGE, G.; DE VRIES, E.G.; TE MEERMAN, G.J.; VAN DER ZEE, A.G. Interleukin-10 and Fas polymorphism and susceptibility for (pre) neoplastic cervical disease. **Int. Jour. Gynecol. Cancer**, Cambridge, v. 15(3), p. 282-90, 2005.
- ZUR HAUSEN, H. Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. **Lancet**, v.2, p.489-491, 1986.

10- *Resumo*

O Papilomavírus Humano (HPV) é uma infecção comum em mulheres em todo o mundo. Contudo, apenas uma pequena porcentagem de mulheres, com infecção persistente por genótipos oncogênicos de HPV, irão desenvolver lesões intraepiteliais escamosas de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL) podendo progredir para o câncer cervical. Os componentes genéticos e imunológicos individuais parecem ser importantes na relação entre a infecção persistente pelo HPV e a carcinogênese. A resposta imune é fundamentalmente importante no desenvolvimento, manutenção e/ou progressão do câncer cervical. Dependendo do padrão de citocinas produzidas, estas podem levar à tolerância imunológica, indução e manutenção de mecanismos imunopatológicos, como desenvolvimento das neoplasias intraepiteliais cervical (NIC) propiciando a evolução para o câncer cervical. Portanto, o objetivo desse estudo foi traçar qual perfil imunológico (Th1, Th2 ou Treg) poderia estar envolvido nas lesões cervicais de baixo e alto grau e no câncer cervical. Verificando assim, a expressão das citocinas: IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-4, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, utilizando a técnica da RT-PCR e posteriormente à PCR com condições e primers específicos para cada citocina. O estudo foi realizado com biópsias de 28 pacientes com lesões intraepiteliais cervical de baixo (HPV/NIC I), 53 alto grau (NIC II e NIC III), 25 com câncer (Invasivo) e 20 mulheres normais (grupo controle), ou seja, sem lesões do colo do útero induzidas pelo HPV. As biópsias foram realizadas somente na presença de zona transformação anormal pela colposcopia, estas foram incluídas em 1 mL de Trizol, para a extração do DNA e RNA. Todas as amostras de RNA foram submetidas a RT-PCR para β -actina e citocinas. O DNA foi utilizado para pesquisa de HPV 16 e/ou 18 utilizando a técnica de PCR. Após a PCR as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas por nitrato de prata. A idade das mulheres que participaram do estudo variou entre 16 a 78 anos (média=31,73 anos), no grupo daquelas que apresentavam lesões cervicais, e 39 a 66 anos (média=48,6 anos) no grupo controle. Todas as amostras com lesões cervicais e controles foram submetidas a RT-PCR para β -actina como controle das reações e 100% delas se mostraram positivas. A amplificação do IFN- γ e da IL-2 foram positivas em 21 (19,81%) pacientes com lesões cervicais sendo que para o IFN- γ : 6(21,43%) eram do grupo LSIL, 8 (15,10%) HSIL e 7 (28%) câncer cervical. Para a IL-2, 3 (10,71%) faziam parte do grupos LSIL, 14 (26,42%) HSIL e apenas 4 (16%) eram do grupo de lesões invasivas. No grupo controle apenas 1 (5%) paciente do grupo controle foi positiva para IFN- γ e 6 (30%) para a IL-2. Tiveram 34 (32,08%) amostras positivas no grupo das pacientes com lesões cervicais para a IL-12, sendo que, 7 (25%) eram do grupo LSIL, 22 (41,51%) HSIL e 5 (20%) tinham câncer cervical. No grupo controle 12 (60%) amostras foram positivas para essa citocina ($p=0,0174$). Para o TNF- α 39 (36,79%) pacientes com lesões cervicais foram positivas para esta citocina, sendo que, 9 (32,14%) eram do grupo LSIL, 27 (50,94%) HSIL e somente 3 (12%) no grupo de lesões invasivas. No grupo controle 14 (70%) pacientes foram também positivas para esta citocina ($p=0,0058$). A IL-10, 81(76,42%) amostras do grupo das pacientes com lesões cervicais foram positivas, destas 19 (67,86%) eram do grupo LSIL, 39 (73,58%) HSIL e 23 (92%) do grupo dos invasivos. No grupo controle 17 (85%) pacientes apresentaram positividade para IL-10. A IL-4 apresentou expressão em 30 (28,30%) pacientes do grupo com lesões cervicais, destas 10 (35,71%) tinham LSIL, 14 (26,42%) HSIL, e 6 (24%) câncer cervical; somente 2 (10%) amostras controles foram positivas para tal citocina. Para o TGF- β 1 48 pacientes (45,28%) apresentaram expressão, sendo 11 (39,29%) LSIL, 25 (47,17%) HSIL e 12 (48%) para câncer cervical, enquanto

que nenhuma amostra controle foi positiva ($p=0,0001$). Para o TGF- β 2, 61 (57,55%) amostras foram positivas para o grupo das pacientes com lesões cervicais, destas, 14 (50%) eram do grupo LSIL, 30 (56,60%) HSIL e 17 (68%) câncer cervical; apenas 2 (10%) amostras do grupo controle foram positivas para esta citocina ($p<0,0001$). Com relação ao TGF- β 3, 35 (33,02%) pacientes foram positivas, sendo 5 (17,86%) LSIL, 16 (30,19%) HSIL e 14 (56%) com câncer cervical. Todas as amostras controles foram negativas para esta citocina ($p<0,0001$). Então, ao analisarmos o perfil de resposta imune local das pacientes com lesões induzidas pelo HPV em relação às pacientes controles, pode-se observar que somente 11 (10,38%) das 106 pacientes com lesões apresentaram perfil do tipo Th1, já as pacientes controles 15 (75%) delas apresentaram este perfil ($p<0,0001$). O perfil Th2 foi determinado em 30 (28,30%) pacientes com lesões e em apenas 2 (10%) das pacientes controles ($p=0,0846$). Com uma diferença altamente significativa ($p=0,0002$) o perfil Treg foi caracterizado em 58 (54,72%) pacientes com lesões induzidas pelo HPV e em apenas 2 (10%) pacientes controles. Apenas 7 (6,60%) pacientes com lesões e 1 (5%) paciente controle foram caracterizadas como um perfil indeterminado ($p=0,7873$). As pacientes que apresentaram perfil indeterminado foram aquelas que apresentaram apenas a expressão da citocina IL-10, que, portanto não é uma citocina característica de nem um dos três perfis analisados, podendo esta apresentar-se associada ao IFN- γ e caracterizar o perfil Th1, associada a IL-4 caracterizando o perfil Th2 ou associada aos TGF- β caracterizando, neste caso, um perfil de resposta imune Tregulatório (Treg). **Conclusões:** A citocina mais prevalente dentre os grupos LSIL/HSIL/ Invasivos e controles foi a IL-10; Nas Lesões Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL) não houve um perfil de resposta imune local predominante, pois a proporção entre Th2 e Treg foi igual (35,71%); Nas Lesões Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) e na Neoplasia Invasiva o perfil de resposta imune local que prevaleceu foi o Treg, com 58,49% e 68%, respectivamente; Houve diferença estatisticamente significativa entre o perfil de resposta imune Treg e os outros perfis (Th1, Th2 e indeterminado) de todos os grupos: LSIL, HSIL e Invasivo; O perfil de resposta imune local das pacientes controles foi caracterizado como sendo Th1 em 75% das amostras; Com o aumento do grau da lesão induzida pelo HPV, a resposta imune local se caracteriza em Tregulatório (Treg).

Palavras-Chave: Neoplasia Intraepitelial Cervical, LSIL, HSIL, Câncer Cervical, Citocinas, Perfil da Resposta Imune.

11- Abstract

The Human Papillomavirus (HPV) infection is common in women worldwide. However, only a small percentage of women with persistent infection by oncogenic genotypes of HPV, will develop low squamous intraepithelial lesions (LSIL) and high grade (HSIL) can progress to cervical cancer. The individual immunological and genetic components appear to be important in the relationship between persistent HPV infection and carcinogenesis. The immune response is fundamentally important in the development, maintenance and/or progression of cervical cancer. Depending on the pattern of cytokines produced, they can lead to immune tolerance, induction and maintenance of immunopathological mechanisms, such as development of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) leading to changes to cervical cancer. Therefore, the objective of this study was mapping which immunological profile (Th1, Th2 or Tregulatory - Treg) could be involved in cervical lesions of low and high grade and in cervical cancer. Noting this, the expression of cytokines: IL-2, IL-12, IFN-, TNF- α , IL-10, IL-4, TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3, using the technique of RT-PCR and subsequent PCR with the conditions and primers specific for each cytokine. The study was performed with biopsies of 28 patients with cervical intraepithelial lesions of low (HPV/CIN I), 53 high grade (CIN II and CIN III), 25 with cancer and 20 normal women (control group), or without lesions of the cervix caused by HPV. The biopsies were performed only in the presence of abnormal transformation zone for colposcopy, these were included in 1 mL of TRIzol for extraction of RNA. All RNA samples were subjected to RT-PCR for β -actin and cytokines. After PCR the samples were subjected to electrophoresis on a polyacrylamide gel and stained by silver nitrate. The age of the women who participated in the study ranged from 16 to 80 years (mean = 35.20 ± 13.31 years), the group of those who had cervical lesions, and 30 to 80 years (mean = 48.6 ± 7.89 years) in the control group. All samples with cervical lesions and controls were subjected to RT-PCR for β -actin as control of reactions and 100% of them were positive. The amplification of IFN- γ and IL-2 were positive in 21 (19.81%) patients with cervical lesions for which the IFN- γ : 6 (21.43%) were LSIL group, 8 (15.10%) HSIL and 7 (28%) cervical cancer. For IL-2, 3 (10.71%) groups were part of LSIL, 14 (26.42%) HSIL and only 4 (16%) were the group of invasive lesions. In the control group only 1 (5%) patient in the control group was positive for IFN- γ and 6 (30%) for IL-2. Had 34 (32.08%) positive samples in the group of patients with cervical lesions to the IL-12, where 7 (25%) were LSIL group, 22 (41.51%) HSIL and 5 (20%) had cervical cancer. In the control group 12 (60%) samples were positive for this cytokine ($p=0.0174$). For the TNF- α 39 (36.79%) patients with cervical lesions were positive for this cytokine, and, 9 (32.14%) were LSIL group, 27 (50.94%) HSIL and only 3 (12%) in the group of invasive lesions. In the control group 14 (70%) patients were positive for this cytokine ($p=0.0058$). The IL-10, 81 (76.42%) samples of the group of patients with cervical lesions were positive, of these 19 (67.86%) were LSIL group, 39 (73.58%) HSIL and 23 (92%) the invasive group. In the control group 17 (85%) patients were positive for IL-10. The IL-4 showed expression in 30 (28.30%) patients in the group with cervical lesions, these 10 (35.71%) had LSIL, 14 (26.42%) HSIL, and 6 (24%) cervical cancer; only 2 (10%) control samples were positive for this cytokine. TGF- β 1 for the 48 patients (45.28%) showed expression, while 11 (39.29%) LSIL, 25 (47.17%) HSIL and 12 (48%) for cervical cancer, whereas no control sample was positive ($p=0.0001$). For the TGF- β 2, 61 (57.55%) samples were positive for the group of patients with cervical lesions, of these, 14 (50%) were LSIL group, 30 (56.60%) HSIL and 17 (68%) cervical cancer, only 2 (10%) samples of the control group

were positive for this cytokine ($p < 0.0001$). With respect to TGF- β 3, 35 (33.02%) patients were positive, and 5 (17.86%) LSIL, 16 (30.19%) HSIL and 14 (56%) with cervical cancer. All control samples were negative for this cytokine ($p < 0.0001$). So, when we look at the profile of local immune response of patients with lesions caused by HPV for patients controls, you can see that only 11 (10.38%) of 106 patients with lesions showed Th1-type profile, since the patients controls 15 (75%) of them had this profile ($p < 0.0001$). The Th2 profile was determined in 30 (28.30%) patients with lesions and in only 2 (10%) of control patients ($p = 0.0846$). With a highly significant difference ($p = 0.0002$) the delivery profile was characterized in 58 (54.72%) patients with lesions induced by HPV and only 2 (10%) control patients. Only 7 (6.60%) patients with lesions and 1 (5%) control patients were characterized as an indeterminate profile ($p = 0.7873$). The patients who had indeterminate profile were those that showed only the expression of cytokine IL-10, which therefore is not characteristic of a cytokine or one of the three profiles analyzed, which may present themselves associated with IFN- γ and characterize the Th1 profile, associated with IL-4 characterizing the profile associated with Th2 and TGF- β s characterized, in this case, a profile of immune response Tregulatory (Treg). Conclusions: The squamous intraepithelial lesions of low-grade (LSIL) there was a profile of predominant local immune response, because the proportion of Th2 and delivery was equal; In squamous intraepithelial lesions of high grade (HSIL) and Invasive Neoplasia in the profile of response local immune that prevailed was the delivery. The profile of immune response of patients local control was characterized as Th1 Increasing the degree of injury induced by HPV, the immune response is characterized by local Tregulatory.

Key-Words: Cervical Intraepithelial Neoplasia, LSIL, HSIL, Cervical Cancer, Cytokines, Perfil of Respost Immune

ANEXO 2

Protocolo de Padronização das Citocinas & β -actina

*Ciclos:

1 - 94°C	5 minutos	
2 - 94°C.....	40 segundos	} 35 a 40 ciclos*
3 - TA.....	45 segundos	
4 - 72°C.....	45 segundos	
5 - 72°C.....	10 minutos	
6- 16°C.....	∞	

1) IFN- γ : 40 ciclos*, [cDNA] = 100 ng e temperatura de anelamento = 55°C

- Tampão 10X5 μ L
- MgCl₂ 50 mM.....1,5 μ L
- dNTP 10mM.....0,32 μ L
- Primer F 10 μ M.....1 μ L
- Primer R 10 μ M.....1 μ L
- cDNA 100 ng.....1 μ L
- Taq 5 U/ μ L.....0,2 μ L
- Água ultra pura (injeção) q.s.p.....50 μ L

2) β -actina: 35 ciclos*, [cDNA] = 100 ng, temperatura de anelamento = 64°C e KCl 48 mM

- Tampão 10X2,5 μ L
- $MgCl_2$ 50 mM.....0,75 μ L
- dNTP 10mM.....0,16 μ L
- Primer F 10 μ M.....1 μ L
- Primer R 10 μ M.....1 μ L
- cDNA 100 ng.....1 μ L
- Taq 5 U/ μ L.....0,2 μ L
- KCl 48 mM.....1,61 μ L
- Água ultra pura (injeção) q.s.p.....25 μ L

3) IL-2 e IL-12: 40 ciclos*, [cDNA] = 100 ng e temperatura de anelamento = 66°C

- Tampão 10X2,5 μ L
- $MgCl_2$ 50 mM.....0,75 μ L
- dNTP 10mM.....0,16 μ L
- Primer F 10 μ M.....1 μ L
- Primer R 10 μ M.....1 μ L
- cDNA 100 ng.....1 μ L
- Taq 5 U/ μ L.....0,5 μ L
- Água ultra pura (injeção) q.s.p.....25 μ L

4) TGF- β 3: 40 ciclos*, [cDNA] = 200 ng e temperatura de anelamento = 61,2°C

- Tampão 10X2,5 μ L
- MgCl₂ 50 mM.....0,75 μ L
- dNTP 10mM.....0,16 μ L
- Primer F 10 μ M.....1 μ L
- Primer R 10 μ M.....1 μ L
- cDNA 200 ng.....2 μ L
- Taq 5 U/ μ L.....0,5 μ L
- Água ultra pura (injeção) q.s.p.....25 μ L

5) IL-10: 40 ciclos*, [cDNA] = 100 ng e temperatura de anelamento = 58°C

- Tampão 10X2,5 μ L
- MgCl₂ 50 mM.....0,75 μ L
- dNTP 10mM.....0,16 μ L
- Primer F 10 μ M.....1 μ L
- Primer R 10 μ M.....1 μ L
- cDNA 100 ng.....1 μ L
- Taq 5 U/ μ L.....0,5 μ L
- Água ultra pura (injeção) q.s.p.....25 μ L

6) IL-4: 40 ciclos*, [cDNA] = 100 ng e temperatura de anelamento = 56°C

- Tampão 10X2,5 µL
- MgCl₂ 50 mM.....0,75µL
- dNTP 10mM.....0,16 µL
- Primer F 10 µM.....1 µL
- Primer R 10 µM.....1 µL
- cDNA 100 ng.....1 µL
- Taq 5 U/µL.....0,5 µL
- Água ultra pura (injeção) q.s.p.....25 µL

7) TGF-β2: 40 ciclos*, [cDNA] = 200 ng e temperatura de anelamento = 60,4°C

- Tampão 10X2,5 µL
- MgCl₂ 50 mM.....0,75µL
- dNTP 10mM.....0,16 µL
- Primer F 10 µM.....1 µL
- Primer R 10 µM.....1 µL
- cDNA 200 ng.....2 µL
- Taq 5 U/µL.....0,5 µL
- Água ultra pura (injeção) q.s.p.....25 µL

8) TGF- β 1: 40 ciclos*, [cDNA] = 200 ng, temperatura de anelamento = 55°C e KCl 45 mM

- Tampão 10X2,5 μ L
- MgCl₂ 50 mM.....0,75 μ L
- dNTP 10mM.....0,16 μ L
- Primer F 10 μ M.....1 μ L
- Primer R 10 μ M.....1 μ L
- cDNA 200 ng.....2 μ L
- KCl 45 mM.....1,51 μ L
- Taq 5 U/ μ L.....0,5 μ L
- Água ultra pura (injeção) q.s.p.....25 μ L

9) TNF- α : 40 ciclos*, [cDNA] = 100 ng, temperatura de anelamento = 73°C

- Tampão 10X2,5 μ L
- MgCl₂ 50 mM.....0,75 μ L
- dNTP 10mM.....0,16 μ L
- Primer F 10 μ M.....1 μ L
- Primer R 10 μ M.....1 μ L
- cDNA 100 ng.....1 μ L
- Taq 5 U/ μ L.....0,5 μ L
- Água ultra pura (injeção) q.s.p.....25 μ L

ANEXO 3

Amostras com Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL)

Amostras			Citocinas Expressas									Perfil da Resposta Imune
Nº amostra	RG da paciente	Biópsia	IL-2	IL-12	TNF-a	IFN-g	IL-4	IL-10	TGF-b1	TGF-b2	TGF-b3	TH
33	RG-101793	B06-2428 = METAPLASIA			TNF-a							TH1
34	RG-483306	B06-3151 = METAPLASIA		IL-12			IL-4	IL-10				TH2
35	RG-51848	B06-4511 = METAPLASIA		IL-12		IFN-g	IL-4	IL-10	TGF-b1	TGF-b2	TGF-b3	TH2
46	RG-3927	B05-6033 = METAPLASIA					IL-4	IL-10	TGF-b1			TH2
47	RG-250242	B06-4621 = METAPLASIA				IFN-g	IL-4	IL-10	TGF-b1	TGF-b2		TH2
52	RG-252093	B07-1783 = METAPALSIA	IL-2				IL-4	IL-10	TGF-b1	TGF-b2	TGF-b3	TH2
58	RG-298785	B06-2006 = METAPLASIA		IL-12								TH1
71	RG-12161	B06-4525 = METAPLASIA			TNF-a					TGF-b2		Treg
76	RG-143569	B07-1750 = METAPLASIA			TNF-a				TGF-b1			Treg
83	RG-384121	B07-3247 = METAPLASIA						IL-10				INDET
53	RG-164070	B06-0910 = METAPLASIA + ASCUS				IFN-g		IL-10				TH1
4	RG-341772	B06-0955 = HPV	IL-2	IL-12	TNF-a							TH1
7	RG-241036	B05-6629 = HPV		IL-12	TNF-a				TGF-b1		TGF-b3	Treg
30	RG-287018	B06-9656 = HPV						IL-10		TGF-b2	TGF-b3	Treg
36	RG-103156	B04-4116 = HPV						IL-10		TGF-b2		Treg
40	RG-465867	B05-4843 = HPV					IL-4	IL-10	TGF-b1	TGF-b2		TH2
54	RG-384123	B07-3247 = HPV					IL-4	IL-10	TGF-b1	TGF-b2		TH2
73	RG-375891	B07-0438 = HPV						IL-10				INDET
87	RG-20998	B07-4064 = HPV						IL-10		TGF-b2		Treg

1	RG-144005	B05-5100 HPV + NIC I				IFN-g			TGF-b1	TGF-b2		Treg
3	RG-209605	B06-0701 = HPV + NIC I			TNF-a							TH1
8	RG-489974	B06-0551 = HPV + NIC I			TNF-a	IFN-g			TGF-b1			Treg
29	RG-489974	B06-0551 = HPV + NIC I					IL-4	IL-10		TGF-b2		TH2
31	RG-223926	B06-0764 = HPV + NIC I	IL-2	IL-12		IFN-g	IL-4	IL-10	TGF-b1	TGF-b2	TGF-b3	TH2
32	RG-223926	B06-4515 = HPV + NIC I		IL-12			IL-4	IL-10				TH2
77	RG-179576	B07-1934 = HPV + NIC I			TNF-a			IL-10		TGF-b2		Treg
80	RG-	NIC I			TNF-a			IL-10				TH1
88	RG-76427	B06-6018 = HPV + NIC I						IL-10		TGF-b2		Treg

Amostras com Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL)

Amostras			Citocinas Expressas									Perfil da Resposta Imune
Nº amostra	RG da paciente	Biópsia	IL-2	IL-12	TNF-a	IFN-g	IL-4	IL-10	TGF-b1	TGF-b2	TGF-b3	TH
5	RG-2851	B05-4997 = HPV + NIC II	IL-2	IL-12	TNF-a	IFN-g						TH1
2	RG-412712	B05-5489 = HPV + NIC II		IL-12	TNF-a			IL-10				TH1
9	RG-278219	B05-6052 = HPV + NIC II			TNF-a			IL-10	TGF-b1			Treg
10	RG-505606	B05-4864 = HPV + NIC II	IL-2		TNF-a						TGF-b3	Treg
15	RG-465913	B06-0762 = HPV + NIC II		IL-12	TNF-a			IL-10		TGF-b2		Treg
18	RG-49214	B06-1227 = HPV + NIC II		IL-12	TNF-a			IL-10	TGF-b1	TGF-b2		Treg
37	RG-221687	B04-4381 = HPV + NIC II		IL-12				IL-10				TH1
41	RG-2051834	B05-4997 = HPV + NIC II					IL-4	IL-10				TH2
42	RG-75401	B04-1468 = HPV + NIC II					IL-4	IL-10				TH2
44	RG-482286	B04-1746 = HPV + NIC II					IL-4	IL-10	TGF-b1			TH2
45	RG-412712	B04-4378 = HPV + NIC II		IL-12			IL-4	IL-10				TH2
55	RG-512300	B07-4377 = HPV + NIC II				IFN-g			TGF-b1	TGF-b2		Treg
56	RG-487386	B07-3950 = HPV + NIC II					IL-4	IL-10	TGF-b1	TGF-b2		TH2
84	RG-512300	B07-4377 = HPV + NIC II						IL-10				INDET
85	RG-487386	B07-3950 = HPV + NIC II								TGF-b2		Treg
96	RG-402574	B07-1472 = HPV + NIC II						IL-10				INDET
11	RG-268148	B05-5256 = HPV + NIC III		IL-12	TNF-a	IFN-g					TGF-b3	Treg
12	RG-135240	B05-5413 = HPV + NIC III		IL-12	TNF-a				TGF-b1	TGF-b2		Treg

13	RG-5633	B05-5633 = HPV + NIC III			TNF-a			IL-10		TGF-b2	TGF-b3	Treg
14	RG-419069	B06-3160 = HPV + NIC III c/ microinvasão		IL-12	TNF-a	IFN-g		IL-10	TGF-b1	TGF-b2	TGF-b3	Treg
6	RG-499015	B05-5629 = HPV + NIC III	IL-2	IL-12	TNF-a	IFN-g			TGF-b1			Treg
16	RG-173874	B06-1714 = HPV + NIC III		IL-12	TNF-a					TGF-b2		Treg
17	RG-510159	B06-0983 = HPV + NIC III		IL-12	TNF-a			IL-10	TGF-b1	TGF-b2		Treg
19	RG-316379	B06-2889 = HPV + NIC III	IL-2		TNF-a				TGF-b1	TGF-b2	TGF-b3	Treg
20	RG-499654	B06-1647 = HPV + NIC III	IL-2	IL-12				IL-10		TGF-b2	TGF-b3	Treg
21	RG-508334	B06-3029 = HPV + NIC III	IL-2	IL-12				IL-10		TGF-b2	TGF-b3	Treg
22	RG-324760	B06-3125 = HPV + NIC III	IL-2	IL-12	TNF-a					TGF-b2	TGF-b3	Treg
23	RG-482361	B04-2809 = HPV + NIC III	IL-2		TNF-a			IL-10	TGF-b1	TGF-b2	TGF-b3	Treg
24	RG-334862	B04-4521 = HPV = NIC III	IL-2	IL-12	TNF-a			IL-10		TGF-b2	TGF-b3	Treg
25	RG-188808	B04-4677 = HPV + NIC III	IL-2	IL-12	TNF-a			IL-10		TGF-b2	TGF-b3	Treg
27	RG-485104	B04-3511 = HPV + NIC III	IL-2	IL-12	TNF-a			IL-10	TGF-b1			Treg
28	RG-137730	B04-6155 = HPV + NIC III			TNF-a			IL-10	TGF-b1	TGF-b2		Treg
38	RG-492788	B04-6020 = NIC III			TNF-a			IL-10	TGF-b1			Treg
39	RG-56239	B00-2221 = NIC III			TNF-a							TH1
43	RG-259163	B04-2450 = METAPLAISIA + NIC III		IL-12			IL-4	IL-10		TGF-b2	TGF-b3	TH2
48	RG-519940	B06-4623 = HPV + NIC III c/ extensão glandular				IFN-g	IL-4	IL-10		TGF-b2		TH2
50	RG-17824	B06-5782 = HPV + NIC III					IL-4	IL-10	TGF-b1	TGF-b2		TH2
51	RG-477363	B04-4678 = HPV + NIC III	IL-2			IFN-g			TGF-b1	TGF-b2		Treg
57	RG-190568	B07-4063 = NIC III	IL-2				IL-4	IL-10	TGF-b1	TGF-b2		TH2
60	RG-214958	B07-3226 = NIC III	IL-2	IL-12			IL-4	IL-10	TGF-b1		TGF-b3	TH2
64	RG-362709	B05-4339 = NIC III				IFN-g	IL-4	IL-10		TGF-b2	TGF-b3	TH2
70	RG-135249	B05-5413 = HPV + NIC III			TNF-a		IL-4		TGF-b1	TGF-b2		TH2
74	RG-508474	B07-1367 = HPV +NIC III			TNF-a		IL-4		TGF-b1	TGF-b2		TH2
75	RG-251873	B07-1641 = HPV + NIC III			TNF-a			IL-10	TGF-b1			Treg
78	RG-369834	B07-1932 = HPV + NIC III			TNF-a			IL-10		TGF-b2	TGF-b3	Treg
81	RG-39520	B07-3044 = HPV + NIC III			TNF-a			IL-10				TH1
86	RG-190568	B07-4063 = NIC III						IL-10		TGF-b2		Treg
92	RG-144708	B06-3856 = NIC III		IL-12				IL-10	TGF-b1			Treg
93	RG-362709	B05-4339 = NIC III						IL-10	TGF-b1			Treg
94	RG-214958	B06-3226 = NIC III						IL-10	TGF-b1			Treg
95	RG-223380	B05-2489 = NIC III						IL-10				INDET
97	RG-34540	B07-1475 = HPV + NIC III						IL-10		TGF-b2	TGF-b3	Treg
103	RG	NIC III		IL-12			IL-4	IL-10	TGF-b1	TGF-b2		TH2

ANEXO 3

Amostras com Lesões Invasivas

Amostras			Citocinas Expressas									Perfil da Resposta Imune
Nº amostra	RG da paciente	Biópsia	IL-2	IL-12	TNF-a	IFN-g	IL-4	IL-10	TGF-b1	TGF-b2	TGF-b3	TH
26	RG-216047	B04-5422 = HPV + ADENO	IL-2	IL-12	TNF-a					TGF-b2	TGF-b3	Treg
59	RG-142189	B06-2099 = ADENOCARCINOMA		IL-12		IFN-g	IL-4	IL-10	TGF-b1		TGF-b3	TH2
61	RG-80072	B05-4388 = ADENOCARCINOMA		IL-12		IFN-g	IL-4	IL-10			TGF-b3	TH2
62	RG-514317	B0-ADENOCARCINOMA INVASOR						IL-10	TGF-b1	TGF-b2		Treg
68	RG-216047	B04-5422 = NIC III + ADENO						IL-10	TGF-b1	TGF-b2	TGF-b3	Treg
69	RG-80072	B05-4388 = ADENOCARCINOMA INVASOR									TGF-b3	Treg
90	RG-148189	ADENOCARCINOMA						IL-10				INDET
98	RG-173451	B07-1473 = ADENOCARCINOMA				IFN-g		IL-10	TGF-b1		TGF-b3	Treg
99	RG-312576	B07-1474 = ADENOCARCINOMA GRAU IV						IL-10		TGF-b2		Treg
49	RG-486492	B04-3187 = Ca INVASIVO					IL-4	IL-10		TGF-b2		TH2
63	RG-74017	B06-3228 = Ca INVASOR	IL-2			IFN-g	IL-4	IL-10	TGF-b1	TGF-b2	TGF-b3	TH2
65	RG-293656	Ca INVASOR	IL-2			IFN-g	IL-4	IL-10		TGF-b2	TGF-b3	TH2
66	RG-	Ca INVASOR					IL-4	IL-10		TGF-b2	TGF-b3	TH2
67	RG	Ca INVASOR	IL-2					IL-10	TGF-b1	TGF-b2	TGF-b3	Treg
72	RG-17825	Ca INVASOR						IL-10	TGF-b1			Treg
79	RG-55284	B07-2059 Ca INVASIVO			TNF-a			IL-10	TGF-b1	TGF-b2	TGF-b3	Treg
82	RG-18005	HPV + Ca INVASIVO						IL-10				INDET
89	RG-514317	B07-3952 = Ca INVASIVO						IL-10		TGF-b2	TGF-b3	Treg
91	RG-74017	B06-3228 = Ca INVASIVO		IL-12				IL-10	TGF-b1			Treg
100	RG-293656	Ca INVASIVO				IFN-g		IL-10	TGF-b1	TGF-b2		Treg
101	RG	Ca INVASIVO						IL-10	TGF-b1	TGF-b2		Treg
102	RG	Ca INVASIVO						IL-10		TGF-b2		Treg
114	RG	Ca INVASIVO		IL-12	TNF-a	IFN-g		IL-10	TGF-b1	TGF-b2		Treg
115	RG	Ca INVASIVO						IL-10		TGF-b2	TGF-b3	Treg
116	RG	Ca INVASIVO						IL-10		TGF-b2	TGF-b3	Treg

ANEXO 3

Amostras Controles

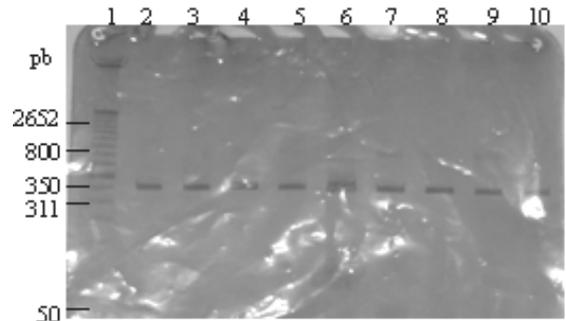
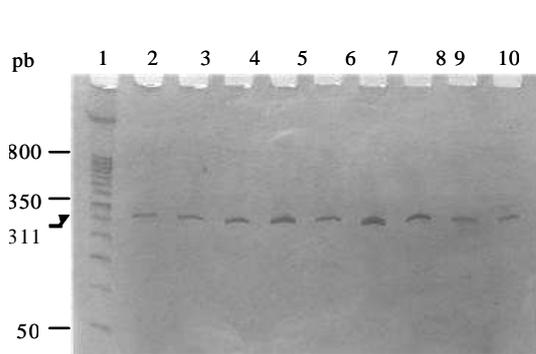
Amostras			Citocinas Expressas									Perfil da Resposta Imune
Nº amostra	RG da paciente	Biópsia	IL-2	IL-12	TNF-a	IFN-g	IL-4	IL-10	TGF-b1	TGF-b2	TGF-b3	TH
1C	RG-481745	LEIOMIOMA			TNF-a			IL-10				TH1
2C	RG-17986	B06-1745 = LEIOMIOMA		IL-12	TNF-a							TH1
3C	RG-5665	B06-1709 = LEIOMIOMA		IL-12	TNF-a					TGF-b2		Treg
4C	RG-11068	LEIOMIOMA		IL-12	TNF-a	IFN-g		IL-10				TH1
5C	RG-491184	LEIOMIOMA	IL-2	IL-12	TNF-a							TH1
6C	RG-426821	LEIOMIOMA	IL-2		TNF-a			IL-10		TGF-b2		Treg
7C	RG	LEIOMIOMA	IL-2	IL-12			IL-4	IL-10				TH2
8C	RG	LEIOMIOMA	IL-2		TNF-a			IL-10				TH1
9C	RG	LEIOMIOMA	IL-2					IL-10				TH1
10C	RG	LEIOMIOMA						IL-10				INDET
11C	RG	LEIOMIOMA		IL-12				IL-10				TH1
12C	RG	LEIOMIOMA			TNF-a			IL-10				TH1
13C	RG	LEIOMIOMA			TNF-a			IL-10				TH1
14C	RG	LEIOMIOMA			TNF-a		IL-4	IL-10				TH2
15C	RG	LEIOMIOMA		IL-12	TNF-a			IL-10				TH1
16C	RG	LEIOMIOMA		IL-12	TNF-a			IL-10				TH1
17C	RG	LEIOMIOMA	IL-2	IL-12				IL-10				TH1
18C	RG-70200	B06-1915 = LEIOMIOMA		IL-12	TNF-a			IL-10				TH1
19C	RG-467397	B06-1766 = LEIOMIOMA		IL-12				IL-10				TH1
20C	RG-511298	B06-1868 = LEIOMIOMA		IL-12	TNF-a			IL-10				TH1

ANEXO 4

Géis representativos da Expressão das Citocinas Estudadas

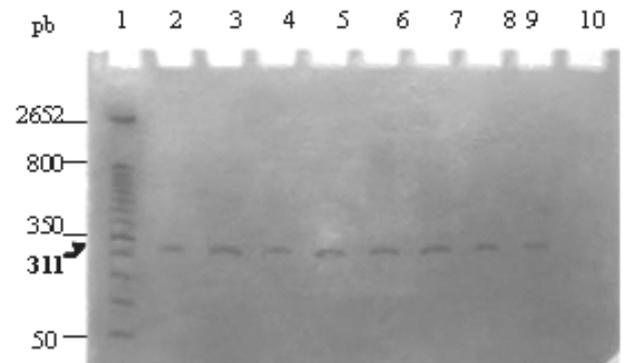
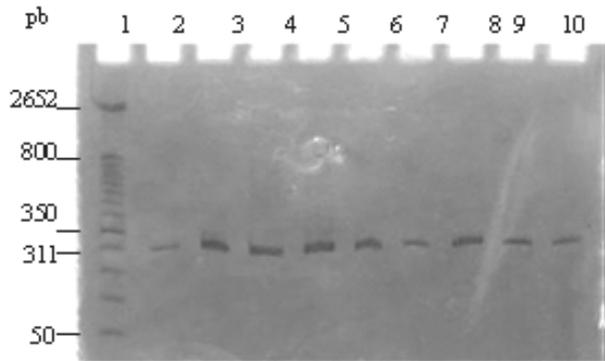
β-ACTINA

A)



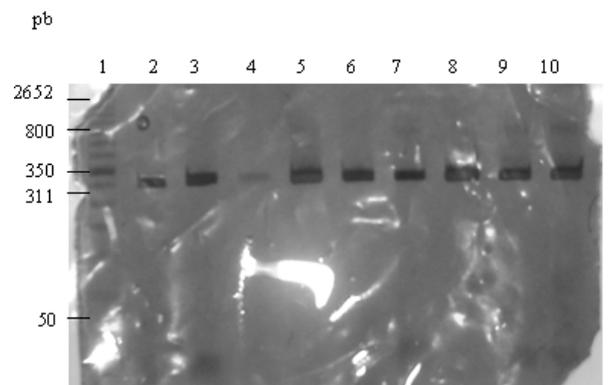
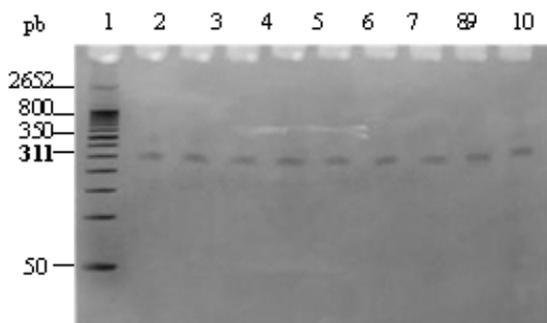
B)

C)



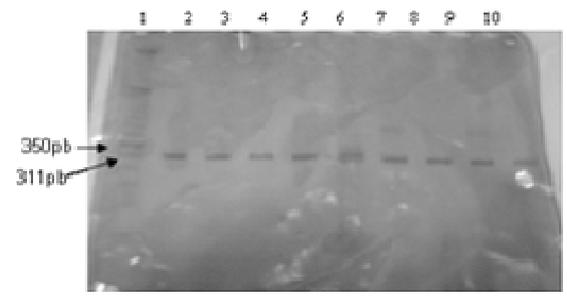
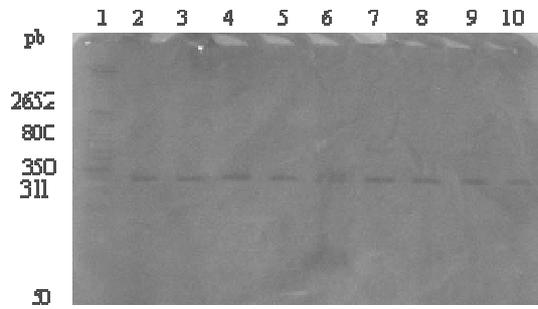
D)

E)

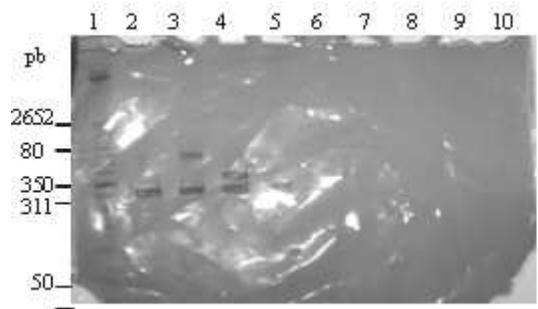


F)

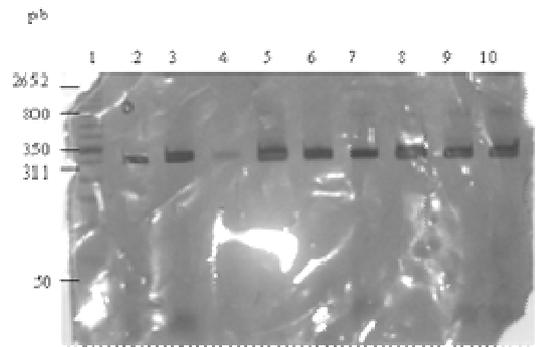
G)



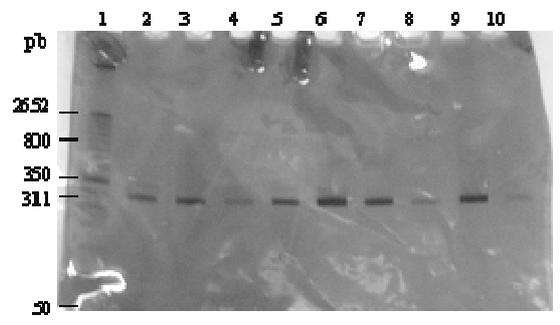
D)



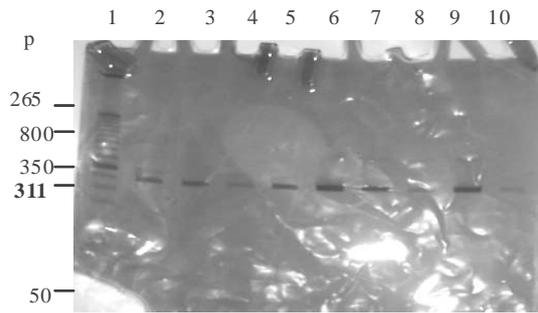
H)



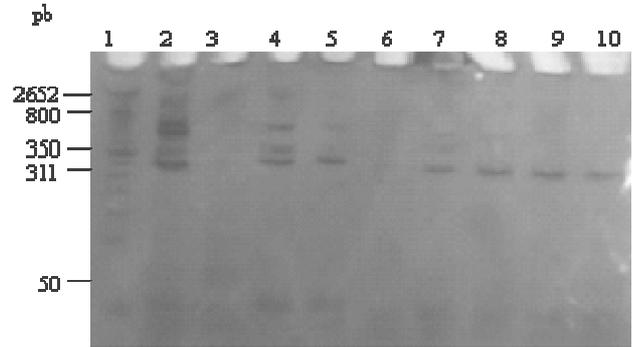
J)



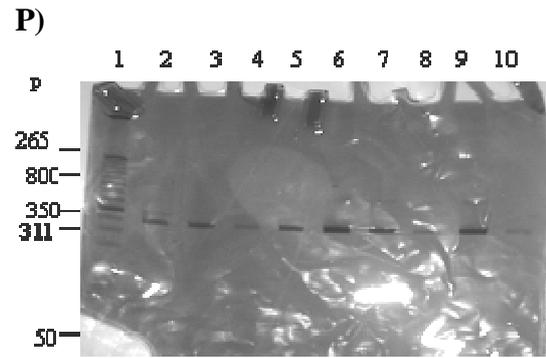
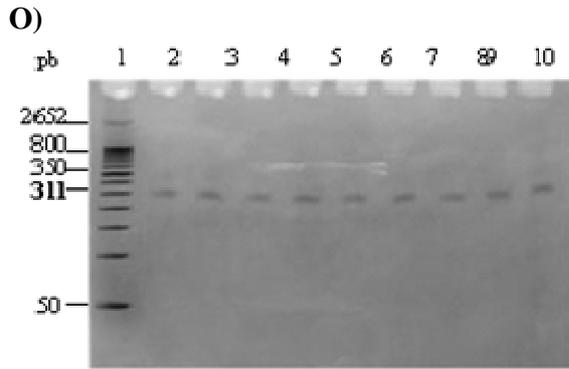
L)



M)



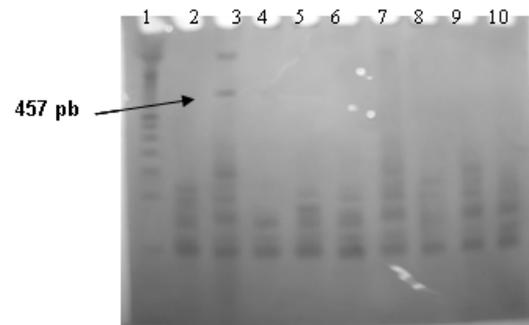
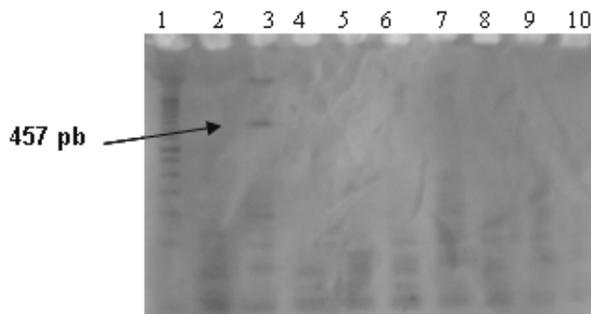
N)



Fotografias de gel de eletroforese em poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para análise dos produtos da PCR. Primer: β -actina (PM=311pb). **Fotos A, B e C:** coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 10 amostras controles; **Fotos D, E e F:** coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 10 amostras pacientes LSIL; **Fotos G, H, I, J, L, M,** coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 10 amostras pacientes HSIL. **Fotos N, O, P,** coluna 1, marcador de pares de base DNA 50 bp; colunas 2 a 10 amostras do grupo das pacientes com lesões invasivas coluna.

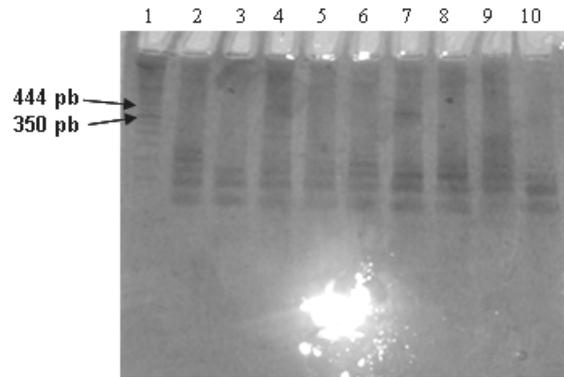
Alguns géis das outras citocinas avaliadas estão representados a seguir.

IL-2

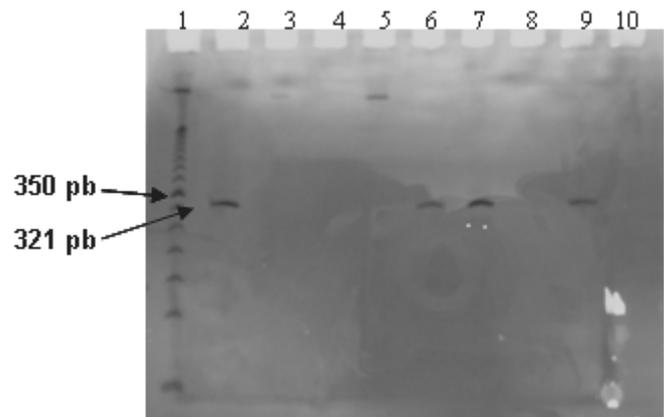
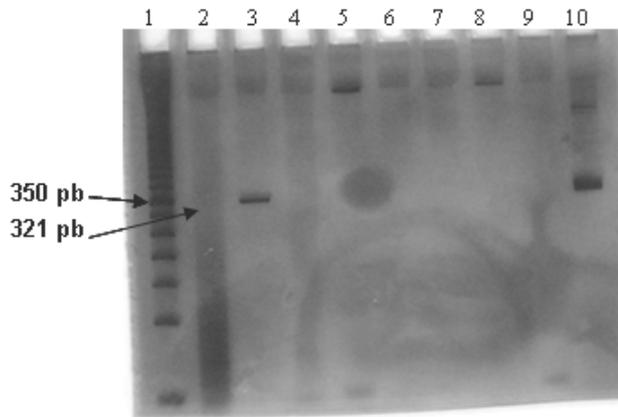


ANEXO 4

TNF- α

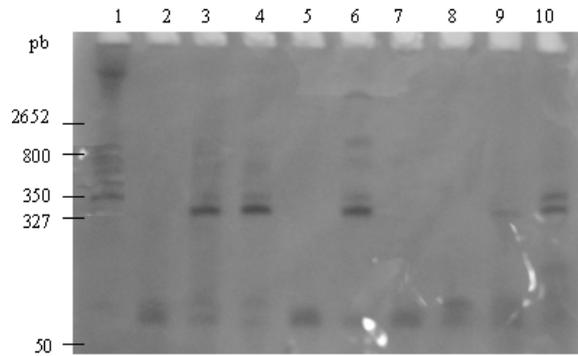
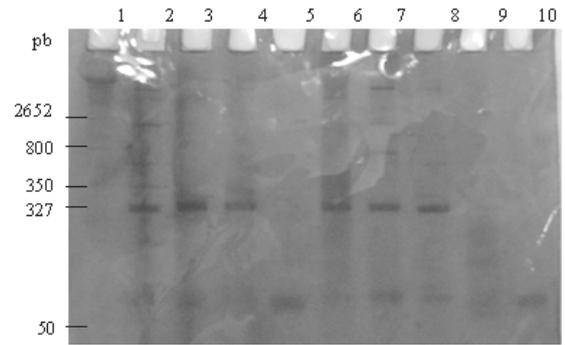
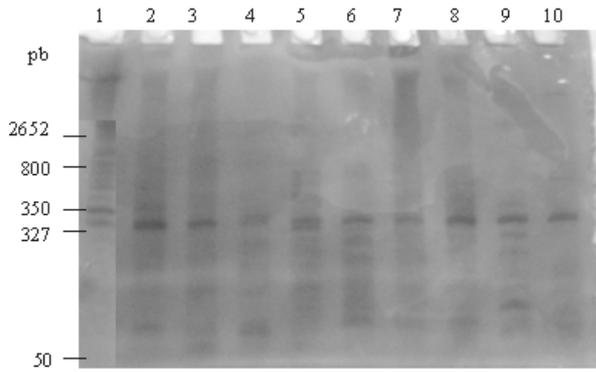


IFN- γ

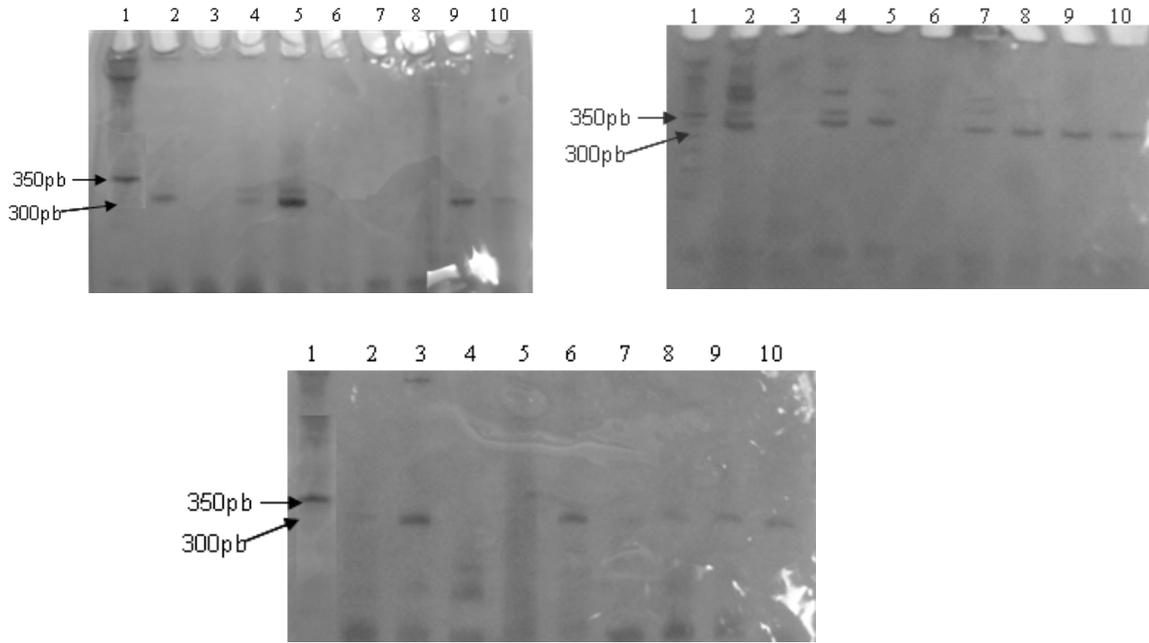


ANEXO 4

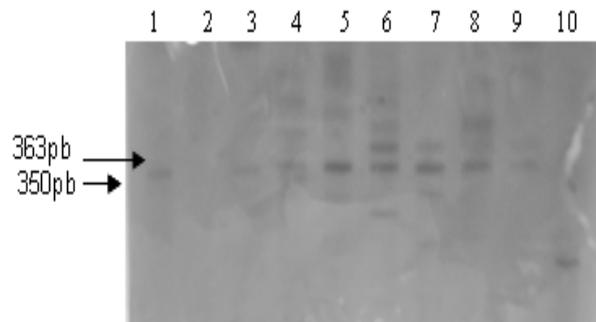
IL-10



IL-4

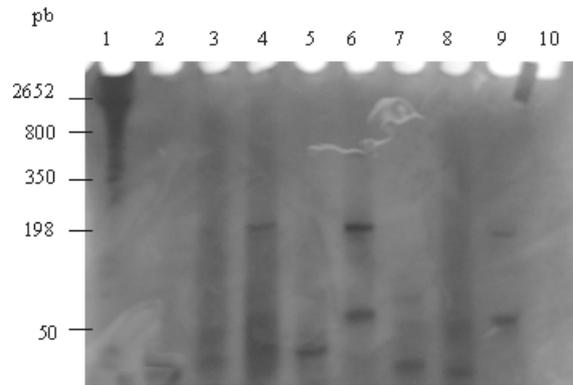


IL-12

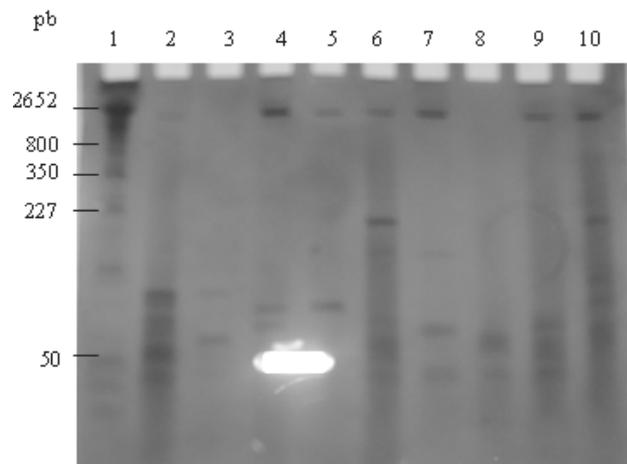


ANEXO 4

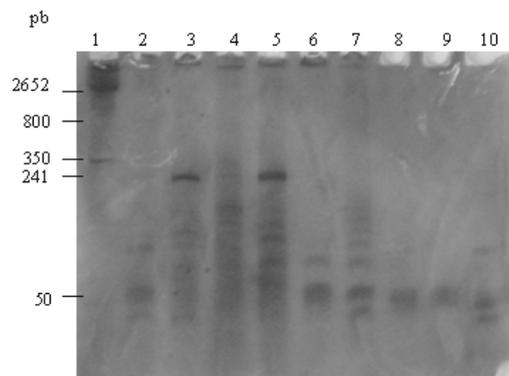
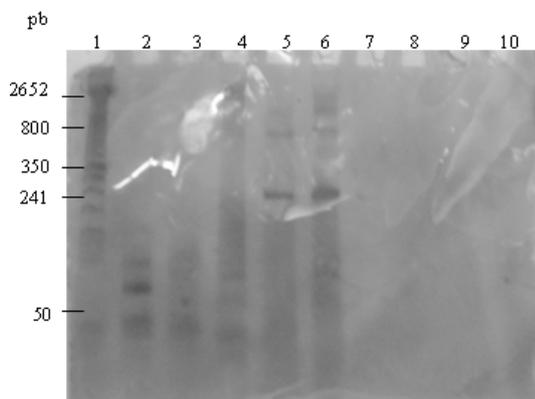
TGF- β 1



TGF- β 2



TGF- β 3



ANEXO 6

**Tabelas do Nível de Significância Estatística das Citocinas Expressas pelas Pacientes
Controles e aquelas com Diferentes Graus de Lesão**

Tabela 1: Comparação estatística das citocinas expressas entre o grupo LSIL e HSIL.

Amostras/ Citocinas	LSIL(%)	HSIL(%)	*p ≤ 0,05
IL-2	3/28 (10,71)	14/53 (26,42)	0,0989
IL-12	7/28 (25)	22/53 (41,51)	0,1405
TNF-α	9/28 (32,14)	27/53 (50,94)	0,1053
IFN-γ	6/28 (21,43)	8/53 (15,1)	0,4733
IL-4	10/28 (35,71)	14/53 (26,42)	0,3834
IL-10	19/28 (67,86)	39/53 (73,58)	0,5866
TGF - β1	11/28 (39,29)	25/53 (47,17)	0,4971
TGF - β2	14/28 (50)	30/53 (56,60)	0,5704
TGF - β3	5 /28 (17,86)	16/53 (30,19)	0,2284

Tabela 2: Comparação estatística das citocinas expressas entre o grupo LSIL e Invasivo

Amostras/ Citocinas	LSIL(%)	INVASIVO(%)	*p ≤ 0,05
IL-2	3/28 (10,71)	4/25 (16)	0,5705
IL-12	7/28 (25)	5/25 (20)	0,6642
TNF-α	9/28 (32,14)	3/25 (12)	0,0803
IFN-γ	6/28 (21,43)	7/25 (28)	0,5788
IL-4	10/28 (35,71)	23/25 (92)	0,3537
IL-10	19/28 (67,86)	6/25 (24)	0,0305
TGF - β1	11/28 (39,29)	12/25 (48)	0,5228
TGF - β2	14/28 (50)	17/25 (68)	0,1843
TGF - β3	5 /28 (17,86)	14/25 (56)	0,0038

ANEXO 6

Tabela 3: Comparação estatística das citocinas expressas entre o grupo LSIL e Controle

Amostras/ Citocinas	LSIL(%)	CONTROLE (%)	*p ≤ 0,05
IL-2	3/28 (10,71)	6/20 (30)	0,0915
IL-12	7/28 (25)	12/20 (60)	0,0145
TNF-α	9/28 (32,14)	14/20 (70)	0,0096
IFN-γ	6/28 (21,43)	1/20 (5)	0,1119
IL-4	10/28 (35,71)	2/20 (10)	0,0425
IL-10	19/28 (67,86)	17/20 (85)	0,1763
TGF - β1	11/28 (39,29)	0/20 (0)	0,0014
TGF - β2	14/28 (50)	2/20 (10)	0,0038
TGF - β3	5 /28 (17,86)	0/20 (0)	0,4590

Tabela 4: Comparação estatística das citocinas expressas entre o grupo HSIL e Invasivo

Amostras/ Citocinas	HSIL (%)	INVASIVO (%)	*p ≤ 0,05
IL-2	14/53 (26,42)	4/25 (16)	0,3083
IL-12	22/53 (41,51)	5/25 (20)	0,0624
TNF-α	27/53 (50,94)	3/25 (12)	0,0010
IFN-γ	8/53 (15,1)	7/25 (28)	0,1771
IL-4	14/53 (26,42)	23/25 (92)	0,8197
IL-10	39/53 (73,58)	6/25 (24)	0,0602
TGF - β1	25/53 (47,17)	12/25 (48)	0,9454
TGF - β2	30/53 (56,60)	17/25 (68)	0,3371
TGF - β3	16/53 (30,19)	14/25 (56)	0,0288

ANEXO 6

Tabela 5: Comparação estatística das citocinas expressas entre o grupo HSIL e Controle

Amostras/ Citocinas	HSIL (%)	CONTROLE (%)	*p ≤ 0,05
IL-2	14/53 (26,42)	6/20 (30)	0,7594
IL-12	22/53 (41,51)	12/20 (60)	0,1578
TNF- α	27/53 (50,94)	14/20 (70)	0,1433
IFN- γ	8/53 (15,1)	1/20 (5)	0,2420
IL-4	14/53 (26,42)	2/20 (10)	0,1305
IL-10	39/53 (73,58)	17/20 (85)	0,3034
TGF - β 1	25/53 (47,17)	0/20 (0)	0,0002
TGF - β 2	30/53 (56,60)	2/20 (10)	0,0003
TGF - β 3	16/53 (30,19)	0/20 (0)	0,0054

Tabela 6: Comparação estatística das citocinas expressas entre o grupo Invasivo e Controle

Amostras/ Citocinas	INVASIVO (%)	CONTROLE (%)	*p ≤ 0,05
IL-2	4/25 (16)	6/20 (30)	0,2617
IL-12	5/25 (20)	12/20 (60)	0,0060
TNF- α	3/25 (12)	14/20 (70)	<0,0001
IFN- γ	7/25 (28)	1/20 (5)	0,0449
IL-4	23/25 (92)	2/20 (10)	0,2222
IL-10	6/25 (24)	17/20 (85)	0,4578
TGF - β 1	12/25 (48)	0/20 (0)	0,0003
TGF - β 2	17/25 (68)	2/20 (10)	<0,0001
TGF - β 3	14/25 (56)	0/20 (0)	<0,0001